ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

AMANDA FRANCINE ASEGA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2003

ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

AMANDA FRANCINE ASEGA

Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Orientador: Profª Dra.: **MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Asega, Amanda Francine
Enzimas do metabolismo de frutanos em Vernonia herbacea (Vell.) Rusby / Amanda Francine Asega. - - Piracicaba, 2003.
98 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Carboidrato vegetal 2. Compositae 3. Enzima vegetal 4. Metabolismo de carboidrato I. Título

CDD 581.19248

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À Pedro, Marlene e Katherine

com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha família, Pedro, Marlene e Katherine, que com muita compreensão e amor me acompanham nesta jornada.

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, além do apoio concedido ao meu aperfeiçoamento profissional.

Às amigas Nair e Rose, minhas eternas professoras, pelo apoio e ajuda nas mais diversas situações.

Ao Paulo Henrique, pelas palavras amigas e pelo incentivo.

À Amanda de Souza, my friend, pelo carinho, amizade e cumplicidade.

Às minhas queridas Maitê e Paty Gaya pela maravilhosa convivência, amizade e companheirismo.

A Carol Vitti pela hospedagem durante a realização das disciplinas em Piracicaba, mas, principalmente pela amizade e cumplicidade.

À Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro pelas sugestões e pelo entusiasmo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelas facilidades oferecidas.

Ao Dr. Edison Chu, chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, onde foram realizados os experimentos.

Às secretárias Ana Alice e Cida (IBt) e Maria Solizete (ESALQ), pelas inúmeras vezes que me auxiliaram.

Às funcionárias da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Mary Monteiro, Dona Amélia e Sirlei, pelo apoio técnico, pela assistência e pelo carinho dedicado durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, Ana Russa, Cesinha (velho amigo), Carla, Clóvis, Claudinha, Débora, Érica, Fausto, Geraldo, Josimara, Ivanzinho, Kelly, Lili, Lourdes, Marilia, Paty Pinho, Vanessa, Raquel, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, que permitiram a realização deste trabalho em um ambiente agradável de amizade.

Ao professor Dr. Ricardo Ferraz do Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela amizade, consideração e assistência durante o período em que estive em Piracicaba.

A todos do Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em especial, Eliane Bassetto (bonequinha Katota), Antonio Amaral, Liliane Camargo, Miriam Moreira, Rogério Falleiros, Daniela Vitti, Rosana Saciloto, Profº Luis Antonio Gallo e Profª Beatriz Appezzato da Glória.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, em especial, ao Dr. Marcos Meca Pinto, aos Srs. Paulo e Samuel pela colaboração na manutenção das plantas no viveiro.

Ao Dr. Zwinglio de Oliveira Guimarães pelos cuidados especiais e pelo carinho dedicado.

Às bibliotecárias Eliana e Silvia, da Divisão de Biblioteca e Documentação da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela atenção dedicada durante a revisão desta dissertação.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto temático (BIOTASP/ FAPESP).

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO ix
SUMMARY xii
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1 Ocorrência e distribuição dos frutanos 5
2.2 Estrutura dos frutanos 7
2.3 Metabolismo de frutanos 10
2.3.1 Fatores que influenciam o metabolismo de frutanos 14
2.3.2 Regulação do metabolismo 16
2.4 Papel fisiológico dos frutanos 18
2.5 Importância econômica dos frutanos 19
3 ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM PLANTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY INDUZIDAS À BROTAÇÃO .....
Resumo 21
Summary 22
3.1 Introdução 24
3.2 Material e Métodos 26
3.3 Resultados e Discussão 33
3.4 Conclusões 45
4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DE FRUTANO-EXOHIDROLASES DE RIZÓFOROS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY .....
Resumo 46
Summary 47
4.1 Introdução 49
4.2 Material e Métodos 52

4.3. Resultados e Discussão..... 58
4.4 Conclusões 82
5 CONCLUSÕES FINAIS..... 83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

Autora: AMANDA FRANCINE ASEGA

Orientadora: Drª MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

RESUMO

A ocorrência de frutanos em espécies de Asteraceae foi amplamente documentada para a flora da região de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu. Dentre estas espécies destaca-se *Vernonia herbacea*, uma planta perene que apresenta órgãos subterrâneos de reserva, denominados rizóforos, que acumulam altos teores de frutanos do tipo inulina. Seu crescimento sazonal é caracterizado pela brotação das gemas existentes nos rizóforos, na primavera, seguida de floração e crescimento vegetativo intenso no verão e dormência no inverno. O conteúdo de frutanos diminui durante a brotação e floração, pois este carboidrato parece ser utilizado para a regeneração dos ramos aéreos que ocorre nesta fase. Estudos preliminares mostraram que a FEH, responsável pela mobilização dos frutanos, apresenta atividade elevada apenas durante a brotação; a despolimerização dos frutanos nos rizóforos de *V. herbacea* nesta fase foi evidenciada pelo aumento de açúcar redutor , especialmente frutose. O presente estudo teve

como objetivo principal a análise da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos e análise do conteúdo e da composição de frutanos em rizóforos de *V. herbacea* induzidas à brotação. A brotação foi induzida pela remoção dos ramos aéreos e as atividades das enzimas FEH , SST, FFT e INV foram determinadas a cada quatro dias durante um mês após a poda. Um aumento na atividade da FEH foi observado entre os dias 13 e 20 após a poda, o que coincidiu com o início da brotação dos novos ramos que ocorreu no 13º dia. Este resultado sugere que a despolimerização de frutanos e a brotação são processos concomitantes em *V. herbacea*, que ocorrem naturalmente durante o ciclo fenológico, mas que também podem ser induzidos em outras fases do ciclo fenológico pela remoção dos ramos aéreos. A FFT parece atuar junto à FEH na diminuição do tamanho das cadeias de frutanos durante a rebrota, enquanto a SST é inibida devido, possivelmente, à interrupção do fornecimento de sacarose aos rizóforos pelos órgãos aéreos. Para a caracterização e purificação parcial da FEH de rizóforos de *V. herbacea* foram utilizados rizóforos de plantas induzidas à brotação através da remoção dos ramos aéreos. O extrato bruto apresentou, para atividade de FEH, pH ótimo de 4,5, temperatura ótima em 30 ºC e curva sigmoidal de concentração de substrato, sugerindo tratar-se de uma enzima alostérica. Esta enzima também apresentou maior especificidade por ligações do tipo β-2,1 do que sobre ligações β-2,6, e maior afinidade por frutanos de cadeias curtas quando comparadas com frutanos de cadeias longas. Utilizando precipitação com sulfato de amônia, cromatografia de afinidade e cromatografias de troca aniônica e catiônica, quatro frações com atividade de FEH foram purificadas. Destas quatro frações, duas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, sendo que os pesos moleculares estimados para uma delas foi de 21 kDa e para outra, esta medida situou-se entre 155

e 39 kDa, devido à ampla faixa de exclusão da coluna utilizada. Os pesos moleculares das outras duas frações foram estimados por SDS-PAGE, sendo que as bandas visualizadas corresponderam a 81,3 e 57,5 kDa para uma e 57,5 kDa para a outra fração.

FRUCTAN METABOLIZING ENZYMES IN *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

Author: AMANDA FRANCINE ASEGA

Adviser: Drª MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

SUMMARY

The occurrence of fructans has been reported in native species of a cerrado area of Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu. *Vernonia herbacea*, one of these species, presents underground organs named rhizophores which accumulate fructans of the inulin type as reserve carbohydrate. The seasonal growth pattern exhibited by plants of *V. herbacea* includes sprouting of buds from the rhizophores in spring, followed by a period of flower development and vegetative growth in summer, and dormancy in winter. The fructan content decreases during sprouting and flowering due to mobilization of this carbohydrate during the regeneration of the new shoots. Preliminary studies showed that FEH, the enzyme responsible for the mobilization of fructan, shows high activity only during sprouting. Fructan mobilization was detected by the increase in the amount of

reducing sugar released, namely fructose. The aim of this work was to analyze the activities of the enzymes of fructan metabolism, FEH, SST, FFT and invertase and the fructan contents in rhizophores of plants induced to sprouting by defoliation. The enzyme activities were measured every 4th day for a month after defoliation. Sprouting of new shoots started around the 13th day, while an increase in FEH activity was detected between 13 and 20 days after defoliation. The results suggest that fructan depolimerization and sprouting are concomitant processes in *V. herbacea* that occur naturally during the phenological cycle; however, these processes can also be induced by defoliation during other stages of the phenological cycle. FFT seems to act together with FEH by catalyzing the decrease in fructan chain size during shoot regrowth, while SST was inhibited, possibly, due to interruption of sucrose supply to rhizophores from the aerial organs. The characterization and partial purification of FEH were done using rhizophores from plants which were induced to sprouting by defoliation. The optimal pH and temperature for FEH activity were pH4,5 and 30ºC, respectively. The substrate concentration curve exhibited a sigmoid shape, suggesting that FEH of *V. herbacea* is an alosteric enzyme. Additionally, this enzyme shows more specificity to β-2,1 than to β-2,6 linked fructan and higher affinity for short chain when compared to long chain fructans. Four fractions presenting FEH activity were partially purified by a combination of ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography, and anion and cation exchange chromatographies. Two of these were submitted to size exclusion chromatography and the apparent molecular size for one of them was 21 kDa and for the other it was estimated to be between 39 and 155 kDa, due to the wide exclusion limit of the column used. The molecular size of the next two fractions were estimated by SDS-

PAGE and the visualized bands corresponded to 81.3 and 57.5 kDa for the first fraction and to 57.5 kDa for the second one.

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 50% da vegetação herbácea e subarbustiva do cerrado apresenta órgãos subterrâneos espessados, o que sugere a importância ecológica dessas estruturas (Mantovani, 1983). Levantamentos florísticos realizados no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu (SP) mostraram a predominância de espécies de Asteraceae no estrato herbáceo, que contribuem com 89 espécies, o que corresponde a 17% das espécies encontradas nessa região (Mantovani,1983).

Após triagem para a detecção de carboidratos e proteínas nos órgãos subterrâneos espessados de plantas nativas dessa área do cerrado brasileiro e da mata do estado de São Paulo realizada por Figueiredo-Ribeiro et al., (1986), foi possível apontar plantas com potencial para a exploração econômica, bem como para estudos fisiológicos e metabólicos dos compostos de reserva em órgãos subterrâneos. Adicionalmente, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993), estudando espécies herbáceas de Asteraceae nesta área restrita do cerrado, verificaram que aproximadamente 60% dessas espécies acumulam frutanos do tipo inulina como carboidratos de reserva em seus órgãos subterrâneos. Em 80% das espécies analisadas esses polímeros foram detectados histologicamente como esferocristais birrefrigentes, quando visualizados sob luz polarizada, em preparações tratadas com álcool absoluto, estando distribuídos principalmente no parênquima de reserva (espécies da tribo Vernonieae) ou concentrados no parênquima do xilema (espécies da tribo Heliantheae), conforme apresentado por Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro

(1993). Dentre estas espécies duas merecem destaque pelos teores elevados de frutanos encontrados em seus órgãos subterrâneos de reserva: *Vernonia herbacea*, cujas moléculas de frutanos atingem grau de polimerização (GP) 40, aproximadamente (Carvalho et al, 1997), e *Viguiera discolor* que, além dos altos teores de frutanos, 80% da massa seca, apresenta moléculas com GP excepcionalmente elevado (170) para a família (Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Vernonia herbacea é uma espécie perene que apresenta crescimento sazonal. Apresenta órgãos subterrâneos espessados, de estrutura caulinar, denominados rizóforos por Menezes et al., 1979, para outras espécies do gênero. Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993).

Diferenças na concentração de frutanos e no tamanho médio das cadeias foram detectadas nos órgãos de reserva em diferentes fases fenológicas (Carvalho & Dietrich, 1993). No período que antecede a dormência, outono, ocorre uma parada no crescimento dos órgãos aéreos, que entram em senescência e sofrem abscisão. Este processo culmina com a entrada da planta em dormência, no inverno. A dormência é caracterizada por um aumento significativo no conteúdo de frutanos nos rizóforos. Entre agosto e setembro ocorre a brotação dos ramos a partir de gemas presentes nos rizóforos. A floração ocorre logo após a brotação. Foi observado um declínio do conteúdo de frutanos entre a brotação e a floração, indicando a mobilização dos mesmos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento da parte aérea e desenvolvimento floral, após a fase de dormência. Variações nas concentrações de frutanos em rizóforos durante o ciclo fenológico desta planta indicam processos de síntese e despolimerização desses compostos e um papel de composto de reserva para estes carboidratos (Carvalho & Dietrich, 1993).

Além de atuarem como carboidratos de reserva para as plantas, os frutanos desempenham um papel ecológico, podendo estar relacionados a mecanismos adaptativos em resposta ao estresse ambiental, oferecendo resistência à seca e ao congelamento, através de sua contribuição na mudança do potencial osmótico da célula (Pontis & Del Campillo, 1985).

Os frutanos são, também, de grande interesse econômico para as indústrias alimentícia e farmacêutica. Na forma de frutose livre, produzida a partir da sua hidrólise, apresentam papel de adoçante não calórico e dietético (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001 e referências ali contidas). Na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS), propiciam inúmeros benefícios à saúde humana. Os FOS não são digeridos pelo organismo humano, sendo considerados alimentos funcionais, além de estimular a absorção de cálcio, magnésio e ferro no cólon (Roberfroid et al., 1995). Na forma de inulina não hidrolisada são utilizados como ingrediente pela indústria alimentícia, devido ao sabor suave e à alta solubilidade sob aquecimento (Dysseler & Hoffem, 1995) e pela indústria farmacêutica, em testes de função renal, sendo considerada a substância ideal para a determinação do ritmo de filtração glomerular (Aires, 1991).

Tendo em vista a importância dos frutanos na indústria e, considerando-se os elevados teores de frutanos nos rizóforos de *V. herbacea* e a facilidade de propagação desta planta, foram realizados estudos sobre nutrição mineral, adubação e produção de inulina, que indicaram ser esta espécie uma fonte alternativa para a produção comercial de inulina (Teixeira et al., 1997; Carvalho et al., 1998).

Estudos preliminares realizados durante o ciclo fenológico de *V. herbacea* mostraram que a enzima responsável pela despolimerização dos frutanos, a frutano exohidrolase (FEH) apresenta atividade elevada apenas na época de brotação (Ribeiro Sobrinho et al., 1996) e que a atividade desta enzima também pode ser induzida, nos rizóforos de *V. herbacea*, em outras fases fenológicas, através da poda e rebrota de seus ramos aéreos (Asega & Carvalho, 1999).

Baseando-se nas informações apresentadas acima, esta dissertação teve como objetivo principal a análise da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos e a análise do conteúdo e da composição de frutanos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação por meio de poda dos ramos aéreos (Capitulo 1). Este trabalho permitirá a ampliação dos conhecimentos sobre o controle do metabolismo de frutanos e sobre o seu papel de reserva e no desenvolvimento de plantas do cerrado.

Uma vez definida a metodologia de indução da atividade da FEH, que possibilitou o estudo desta enzima em outras fases de desenvolvimento da planta, além da brotação, o presente estudo foi aprofundado através da caracterização e da purificação parcial desta enzima (Capítulo 2).

Como a FEH é uma enzima praticamente inativa em rizóforos de *V. herbacea* durante todas as épocas do ano, exceto na época da brotação, estudos com esta enzima são de difícil execução já que o período de brotação é bastante curto. Assim, experimentos que visam à indução da sua atividade são relevantes tendo em vista o estudo do metabolismo de frutanos e o conhecimento do papel destes compostos como carboidratos de reserva. Além disso, a utilização dos frutanos na indústria alimentícia na forma de frutose livre ou de oligossacarídeos poderá ser aprimorada a partir da ampliação do conhecimento do metabolismo de degradação destes compostos.

Pesquisas realizadas com *V. herbacea* e outras espécies do cerrado brasileiro ampliam o conhecimento fisiológico e bioquímico destas plantas e indicam o seu potencial como novas fontes produtoras de substâncias de interesse econômico, reforçando as afirmações de Sano & Almeida (1998) sobre a importância de se preservar as áreas de cerrado em benefício do homem e do meio ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência e distribuição dos frutanos

Os frutanos são reconhecidos como uma classe de carboidratos vegetais há aproximadamente 200 anos e, depois do amido e da sacarose, são os de maior ocorrência entre os vegetais superiores (Hendry & Wallace, 1993).

Os frutanos são também encontrados em briófitas, algas, fungos e bactérias, razão pela qual Hendry (1993) sugeriu a natureza polifilética para a evolução destes compostos. Aproximadamente 15% das angiospermas contêm frutanos, principalmente em ordens consideradas evoluídas, como Poales e Asterales. Dentre as monocotiledôneas que acumulam frutanos encontram-se principalmente as Poaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Iridaceae e Agavaceae e entre as dicotiledôneas, os frutanos são encontrados em espécies de Campanulaceae, Lobeliaceae, Stylidiaceae e em aproximadamente 25000 espécies de Asteraceae (Hendry & Wallace, 1993).

A presença de frutanos em Asteraceae foi amplamente documentada para a flora de regiões temperadas (Pollard & Amuti, 1981) e para a flora tropical e subtropical em região restrita do cerrado brasileiro (Figueiredo-Ribeiro et al. 1986 e Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo mais abundantes em áreas onde o crescimento é sazonal. Hendry e Wallace (1993) sugeriram que a expansão da flora que contêm frutanos coincidiu com o

desenvolvimento da sazonalidade durante os períodos Eoceno – Mioceno. Segundo estes autores, o fato de existirem em quantidades apreciáveis em plantas consideradas mais evoluídas indica que os frutanos não constituem apenas mais uma diversificação biológica, mas sim que haveria um significado evolutivo para o seu aparecimento.

Os frutanos são acumulados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, rizóforos, tubérculos e bulbos, mas podem também ser acumulados em órgãos fotossintetizantes como folhas e caules e em inflorescências e sementes. Em uma mesma planta esses polímeros podem ser encontrados em todos os órgãos, em quantidades variadas. Geralmente os teores são baixos nas folhas e especialmente elevados nas raízes, bulbos, tubérculos, rizomas e, algumas vezes, em frutos verdes (Meier & Reid, 1982).

Nas células, os frutanos e as enzimas envolvidas em seu metabolismo são encontrados nos vacúolos (Frehner et al., 1984), embora sua presença e a da enzima frutano-exohidrolase (FEH) tenham sido detectados também no fluido apoplástico (Livingston & Henson, 1998).

Em espécies de Asteraceae, os frutanos encontram-se distribuidos principalmente no parênquima de reserva ou concentrados no parênquima do xilema, quando visualizados sob luz polarizada em preparações tratadas com álcool absoluto, conforme apresentado por Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993).

Além da ocorrência em espécies de Asteraceae, foi relatada pela primeira vez a presença de frutanos em *Gomphrena macrocephala*, uma Amaranthaceae nativa do cerrado. Nesta espécie, esses polímeros estão presentes nas raízes tuberosas e foram detectados nas células parenquimáticas associadas ao xilema secundário e no interior dos elementos de vaso (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

2.2 Estrutura dos frutanos

Frutanos consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, onde cada membro da série contêm um resíduo de frutose a mais que o membro anterior (Edelman & Jefford, 1968). Esses polímeros de D-frutose apresentam um resíduo de D-glucose geralmente localizado na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α-1,2 como na sacarose (Kandler & Hopf, 1980). O frutano mais simples é um monofrutosil sacarose, um trissacarídeo.

São conhecidos três isômeros do trissacarídeo que diferem entre si pela ligação da frutose a um dos grupos hidroxila da sacarose. A 1-cestose ou 1-cestotriose (1-F-frutosil sacarose, α-glu-1,2-β-fru-1,2-fru) foi o primeiro a ser caracterizado por Bell e colaboradores (Pollock et al. 1996 e referências ali contidas). A 1-cestose é encontrada em todas as espécies que acumulam frutanos, mesmo naquelas onde a série predominante apresenta outro tipo de ligação entre os resíduos de frutose. A 6-cestose apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose, formando α-glu-1,2-β-fru-6,2-fru. E a neocestose (β–fru-2,6-α–glu-1,2-fru) apresenta os dois resíduos de frutose ligados à glucose.

Assim, a 1-cestose e a 6-cestose possuem uma glucose e uma frutose terminais, enquanto a neocestose apresenta a glucose interna.

Cinco classes estruturais de frutanos foram identificadas (Pollock et al., 1996), e podem ser visualizadas na figura 1:

a) frutano do tipo inulina, baseado em 1-cestose, com ligações β-2,1 entre os resíduos de frutose, com GP médio de aproximadamente 35, encontrado principalmente em Asterales (ex.: *Helianthus tuberosus*);

b) frutano do tipo levano, baseado em 6-cestose, com ligações β-2,6 entre os resíduos de frutose, com GP médio de 250, característico de Poales (ex.: *Phleum pratense*);

c) frutano com ligações mistas e ramificados, com glucose na extremidade da cadeia, como na molécula bifurcose, também encontrado em Poales (ex.: *Bromus*, *Triticum*);

d) frutano baseado em neocestose, com ligações β-2,1 entre os resíduos de frutose, encontrado em Liliaceae (ex.: *Asparagus*); e

e) frutano baseado em neocestose, com ligações β-2,6 entre os resíduos de frutose, presente em alguns membros de Poales (ex. : *Avena*).

Além dessas séries, foi encontrada em três espécies de Asteraceae como em *Cichorium intybus*, *H. tuberosus* e *Taraxacum officinale* (Ernst et al., 1996; Van den Ende et al., 1996) uma série redutora, inulo-n-ose, que possui somente frutose com ligações do tipo β-2,1, sem a glucose terminal. Segundo Van den Ende et al., (2002), a origem da série inulo-n-ose não está completamente elucidada. Acreditava-se que esta série resultava do processo de degradação de cadeias de frutanos por ação de endohidrolases ou até mesmo por uma β–glucosidase. Muitas pesquisas foram realizadas e não houve evidencias da existência destas enzimas em plantas. Em *C. intybus* foi demonstrado que esta série não é produto de degradação (Van den Ende et al., 1996), e que essas moléculas são biossintetizadas por uma 1-FFT que catalisa a transferência de frutose da inulina para a frutose livre.

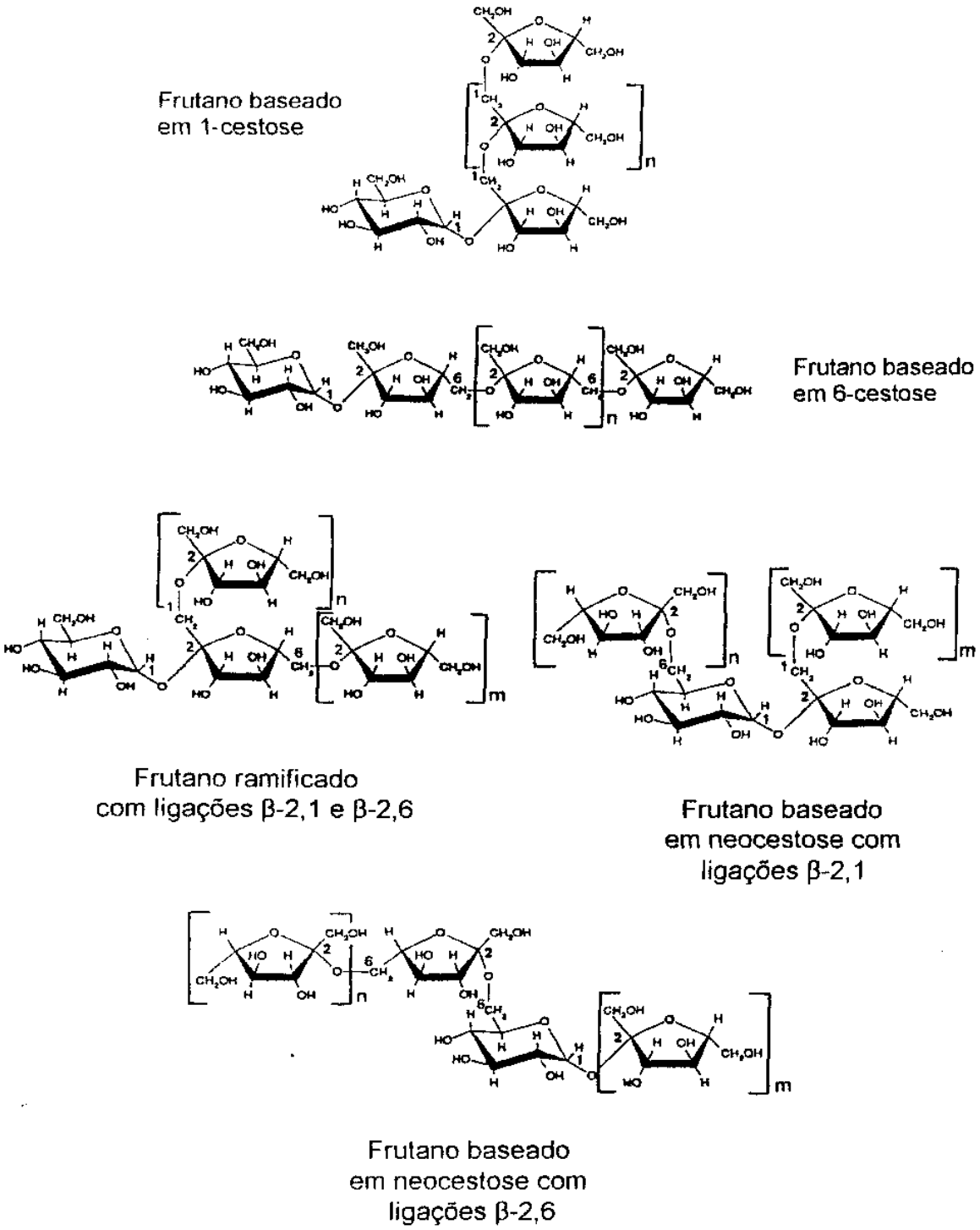

Figura 1. Cinco classes estruturais de frutanos, segundo Carpita et al., (1991) e Livingston et al., (1993).

2.3 Metabolismo dos frutanos

Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose pela ação de frutosiltransferases. Segundo o modelo clássico para síntese destes carboidratos proposto por Edelman & Jefford (1968), para tubérculos de *H. tuberosus*, duas transferases são responsáveis pela síntese de frutanos do tipo inulina: a sacarose: sacarose frutosiltransferase (1-SST), que catalisa irreversivelmente a formação de 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma de glucose, e a frutano:frutano frutosiltransferase (1-FFT), responsável pelo alongamento da cadeia de frutano, catalisando a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. Nesta reação a menor molécula receptora é a sacarose que nunca pode atuar como doadora (Edelman & Jefford, 1968).

A reutilização da glucose liberada durante a síntese de frutanos associa efetivamente o metabolismo de frutanos com o metabolismo energético e primário de carboidratos da célula (Pollock e Chatterton, 1988).

Luscher et al. (1996) mostraram que a combinação das enzimas 1-SST e da 1-FFT purificadas a partir de tubérculos de *H. tuberosus* é necessária para a síntese *de novo* de inulina a partir de sacarose, confirmando assim o modelo clássico de Edelman & Jefford (1968). Van den Ende & Van Laere (1996a), trabalhando com C. *intybus* L., outra espécie de Asteraceae acumuladora de inulina, demostraram também que a combinação das duas enzimas (1-SST e 1-FFT) purificadas promove a síntese *de novo* de frutanos estruturalmente idênticos aos encontrados *in vivo* nesta espécie, tendo como único substrato sacarose em concentrações semelhantes às encontradas nos tecidos radiculares. Entretanto, o GP das moléculas obtidas *in vitro* é sempre menor do que o encontrado *in vivo*. Essa diferença pode ser explicada pela diminuição da concentração de sacarose *in vitro*, pelo acúmulo de glucose e pela instabilidade destas enzimas após um longo período de incubação (Van den Ende et al., 2002).

Diferentemente dos resultados obtidos para *H. tuberosus* e *C. intybus*, Itaya et al., (1997) mostraram que extratos enzimáticos brutos de raízes tuberosas de *Viguiera discolor* são capazes de catalisar a síntese *in vitro* de frutanos com GP até 70 a partir de incubações prolongadas, utilizando nistose como substrato inicial. A obtenção de frutanos com GP elevado também foi verifcada por Cairns et al., (1999). Estes autores mostaram que os extratos enzimáticos brutos de folhas de *Phleum pratense*, quando incubados com sacarose, catalisaram a síntese de frutanos com GP até 35 e que estes frutanos sintetizados *in vitro*, quando utlizados como substrato e re-incubados com sacarose e extrato enzimático, levaram à formação de frutanos com GP até 50.

Além da 1-SST e da 1-FFT, duas enzimas que atuam na biossíntese de outras formas estruturais de frutanos foram isoladas (Vijn & Smeekens, 1999): sacarose: frutano 6 frutosiltransferase (6-SFT) e frutano: frutano 6G frutosiltransferase (6G-FFT). Nenhum precursor fosforilado está envolvido na biossíntese de frutanos.

A biossíntese dos diferentes tipos de frutanos pode ser resumida conforme esquema apresentado na figura 2. A partir da sacarose, a 1-SST produz a 1-cestose e o alongamento da cadeia de frutanos se dá pela ação da 1-FFT, resultando na formação da inulina. A partir da sacarose e 1-cestose, a 6G-FFT produz a neocestose que pela ação da 1-FFT ou 6-SFT, dá origem à neosérie de inulina e à neosérie de levano, respectivamente. A partir da sacarose e da 1-cestose, a 6-SFT produz a bifurcose, que pela ação da 1-FFT ou 6-SFT, leva à formação de um levano ramificado com ligações mistas. Quando somente sacarose está disponível como substrato, a 6-SFT produz a 6-cestose, que pode ser alongada pela 6-SFT e produzir levanos (Vijn e Smeekens 1999). Outra possibilidade para produção de levanos, proposta por Wiemken et al. (1995), envolve a remoção do resíduo de frutose β – 2,1 ligado à bifurcose por uma 1- FFT ou FEH. Entretanto, o modelo clássico para síntese de frutanos proposto por Edelman & Jefford (1968), para tubérculos de

H. tuberosus, sugere que a sacarose é o único substrato para a síntese *de novo* destes compostos.

Sob altas temperaturas e baixas concentrações de substrato, 1-SST e 1-FFT mostraram alguma atividade de β-frutosidase (transferindo resíduos de frutose para água ao invés da sacarose ou frutano) e a 1-SST também apresentou alguma atividade de 1-FFT (Van den Ende et al., 2002).

As enzimas 1-SST e 1-FFT não apresentam cinética de Michaelis-Menten, as atividades dependem das concentrações de ambos, substrato e enzima, e são essencialmente insaturáveis (Koops e Jonker, 1996).

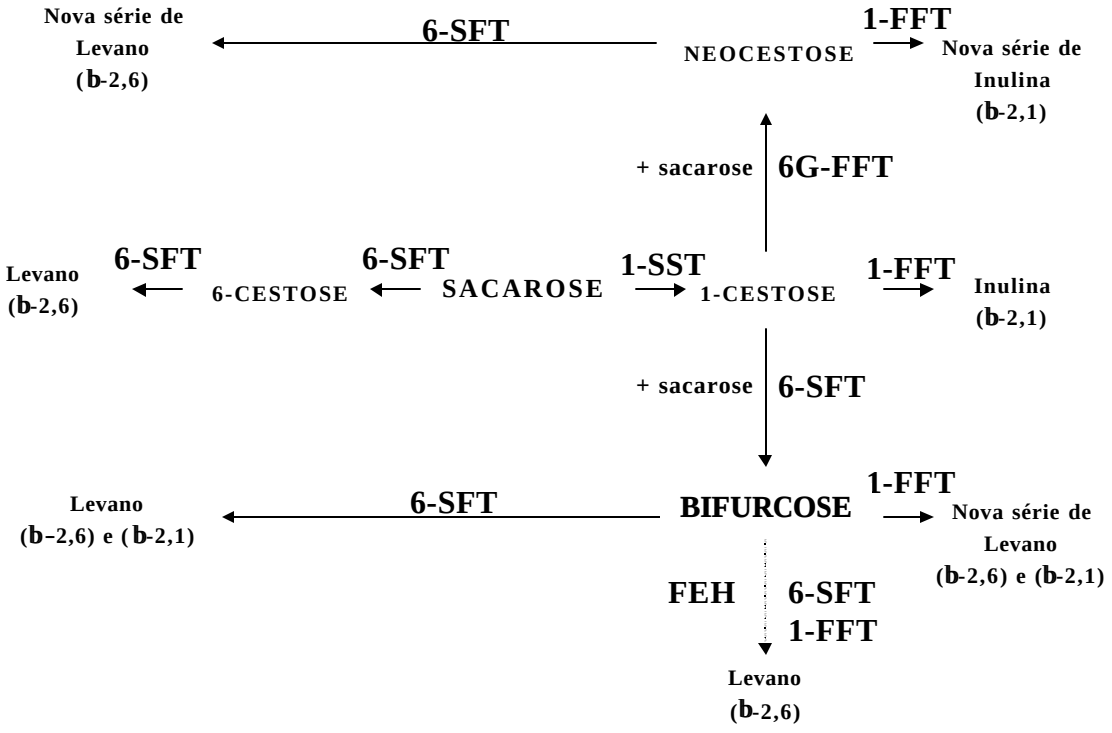

Figura 2. Modelo de biossíntese de frutanos. Adaptado de Vijn & Smeekens (1999).

Várias enzimas de plantas com atividades de 1-SST e de 1-FFT já foram purificadas até a homogeneidade eletroforética e a clonagem destas enzimas vem sendo realizada em alguns laboratórios com o objetivo de melhor compreender a regulação e a especificidade das enzimas envolvidas nos tipos de ligação entre os resíduos de frutose e no comprimento das cadeias de frutanos (Hellwege et al., 1998, Van den Ende et al., 2000b).

O primeiro cDNA isolado foi o da 6-SFT de *Hordeum vulgare* (Sprenger et al., 1995). Após esta clonagem outros cDNAs foram isolados, incluindo o da 6G-FFT de *Allium cepa* (Vijn et al., 1997), da 1-SST de *Cynara scolymus* (Hellwege et al., 1997), de *C. intybus* (De Halleux & Van Cutsem, 1997), de *A. cepa* (Vijn et al., 1998), de *T. officinale* (Van den Ende et al, 2000b), de *Festuca arundinacea* (Lüscher et al., 2000) e de *H. tuberosus* (Van der Meer et al., 1998), e da 1-FFT de *C. scolymus* (Hellwege et al., 1998) e de *H. tuberosus* (Van der Meer et al., 1998).

A hidrólise de frutanos ocorre pela remoção seqüencial dos resíduos terminais de frutose por uma frutano exohidrolase (FEH), segundo o modelo clássico proposto por Edelman & Jefford (1968) para *H. tuberosus*. Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Os principais produtos da FEH são a frutose e a sacarose. Como os açúcares são translocados nas plantas principalmente sob a forma de sacarose, novamente deve haver outra conversão, desta vez, de frutose para glucose, para formar sacarose que então é translocada para fora da célula (Edelman & Jefford, 1968).

Dependendo do tipo de ligação entre os resíduos de frutose que é hidrolisada, pode-se distinguir a 1-FEH, enzima que hidrolisa ligações β-2,1, da 6-FEH, enzima que hidrolisa ligações β-2,6. Embora a FEH tenha sido caracterizada a partir de várias espécies vegetais, poucas foram purificadas até a homogeneidade eletroforética: três 1-FEH de *C. intybus*, a saber 1-FEH I (Claessens et al., 1990), 1-FEH IIa e 1-FEH IIb (De Roover, et al., 1999b; Van den Ende et al., 2001), uma 1-

FEH de *H. tuberosus* (Marx et al., 1997a), uma 6-FEH de *Lolium perenne* (Marx et al., 1997b), uma FEH de *Avena sativa* que hidrolisa preferencialmente ligações β–2,6 (Henson & Livingston, 1996) e uma FEH de *H. vulgare* que é capaz de hidrolisar tanto ligações β–2,1 quanto β–2,6 (Henson & Livingston, 1998).

Entretanto, somente três FEHs de plantas foram clonadas até o momento: 1-FEH I (Van den Ende et al., 2000) e 1-FEH IIa e IIb de *C. intybus* (Van den Ende et al., 2001).

As enzimas do metabolismo de frutanos estão intimamente relacionadas com as invertases. As enzimas de síntese apresentam maior homologia com as invertases vacuolares (42-56% de identidade) do que com as invertases de parede celular (36-39% de identidade). As enzimas de degradação apresentam maior homologia com as invertases de parede celular (43-59% de identidade) do que com as invertases vacuolares (40-41% de identidade). Desta forma, acredita-se que a 1-SST tenha evoluído de uma invertase vacuolar, tornando-se capaz de usar a sacarose como substrato aceptor e que a FFT, após evoluir da SST, tornou-se capaz de usar oligo e polifrutanos como substratos doadores (Van den Ende et al., 2002).

2.3.1 Fatores que influenciam o metabolismo de frutanos

O tamanho médio das moléculas de frutanos pode variar de acordo com a espécie, idade da planta e órgão estudado. Fatores ambientais e o ciclo fenológico da planta podem afetar o tamanho das moléculas à medida que estes fatores interferem no acúmulo ou na utilização dos frutanos. Entretanto, acredita-se que o tamanho máximo das cadeias de frutanos seja determinado geneticamente (Pollock & Chatterton, 1988).

O aumento na concentração de frutanos sugere um aumento das atividades das enzimas de síntese e pode ser verificado sob as seguintes condições: anoxia (Albrecht et al., 1993), baixa temperatura (Jeong & Housley, 1990; Prud'homme et

al., 1993), alta concentração de CO_2 (Smart et al., 1994); iluminação contínua de folhas (Simmen et al., 1993; Penson & Cairns, 1994) alta irradiância (Cairns et al., 2000), exposição à seca (De Roover et al., 2000) e a fotoperíodos curtos (Legnani & Miller, 2001).

A mobilização de frutanos foi observada durante a brotação de bulbos de *Lycoris radiata* (Nagamatsu et al., 1991), a floração de *Hemerocallis* (Bieleski, 1993) e o desenvolvimento de inflorescências de *Phippsia algida* (Solhaug & Aeres, 1994) e de *Campanula rapunculoides* (Vergauwen et al., 2000).

Aumento na atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva foi relacionado à brotação de órgãos aéreos em várias espécies de Asteraceae, seja durante o ciclo normal de desenvolvimento, conforme demonstrado em *T. officinale* (Rutherford & Deacon, 1974), *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996b) e *H. tuberosus* (Marx et al., 1997a), seja durante a brotação em plantas induzidas à brotação após a retirada dos órgãos aéreos, conforme observado em *Polymnia sonchifolia* (Fukai et al.. 1997) e *C. intybus* (De Roover et al., 1999a). Estudos preliminares realizados durante o ciclo fenológico de *V. herbacea* mostraram que a FEH apresenta atividade elevada apenas na época de brotação (Ribeiro Sobrinho et al., 1996) e que a atividade da FEH nos rizóforos de *V. herbacea* também pode ser induzida, em outras fases fenológicas, através da poda e rebrota de seus ramos aéreos (Asega & Carvalho, 1999) e quando submetidas a baixas temperaturas.

O aumento da atividade da FEH em plantas de *C. intybus* pode ser detectado também durante o armazenamento no frio (Van den Ende & Van Laere,1996b) e em plantas tratadas com soluções enriquecidas com nitrogênio após um longo período de deficiência deste elemento (Van den Ende et al., 1999b).

Em Poaceae, também foi detectado aumento na atividade da FEH em plantas de *Lolium perenne* após a retirada das folhas (Marx et al., 1997b, Morvan et al., 1997, Pavis et al., 1998). Os autores observaram, nos restolhos das folhas, não apenas o

aumento da atividade da FEH, mas também a diminuição em 80% dos níveis de frutanos durante as 12 primeiras horas (Pavis et al., 1998) ou durante os dois dias (Morvan et al., 1997) após a desfoliação, demonstrando claramente que o processo de mobilização destes compostos está associado à retirada das folhas nestas plantas.

Variações nas atividades das enzimas de síntese também podem ser verificadas em plantas desfoliadas, como demonstrado por Van den Ende et al., (1999a) em plantas jovens de *C. intybus* desfoliadas que, além do aumento da atividade da FEH, apresentam diminuição da atividade da SST e variações na atividade da FFT durante todo o período experimental.

2.3.2 Regulação do metabolismo

Os genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos parecem ser regulados principalmente em nível de transcrição. Os efetores endógenos e exógenos para a indução destes genes são ainda desconhecidos. O que se acredita é que açúcares, hormônios e diferentes tipos de estresse regulam estes genes na planta (Van den Ende et al., 2002). Dentre estes fatores, estresse nutricional devido à deficiência de nitrogênio (Wang et al., 2000), baixa temperatura, desfoliação seguida de exposição à luz contínua (Wei et al, 2001) em folhas de *H. vulgare*, estresse hídrico em folhas e raízes de *C. intybus*, assim como elevados teores de sacarose, glucose e frutose (Muller et al, 2000; Koroleva et al., 2001; Wei et al, 2001) são capazes de induzir os genes ligados à biossíntese de frutanos.

A região promotora da 6-SFT de *H. vulgare* é a única clonada até o momento (Nagaraj et al., 2001). Os autores concluíram que esta região contém elementos *cis* necessários para dirigir uma expressão dependente da luz ou da sacarose, após observarem que este promotor é inativo em folhas de cevada não induzidas à biossíntese de frutanos, mas que o mesmo encontra-se ativo em folhas que acumulam frutanos em resposta aos tratamentos com luz contínua ou sacarose.

Muller et al., (2000) relataram que os monossacarídeos fosforilados, mas não metabolizados pela hexoquinase, como a manose ou a 2-deoxi-glucose, não induziram a biossíntese de frutanos em folhas de *H. vulgare* e que a trealose induziu fortemente a biossíntese de frutanos e de amido nesta espécie. Os autores sugeriram que a síntese de frutanos em folhas de cevada ocorre independentemente da hexoquinase sendo, provavelmente, baseada na sensibilidade à sacarose e que a trealose pode substituir a sacarose como substância reguladora.

A indução da síntese de frutanos foi também estudada em folhas de *Triticum aestivum* por Noel et al., (2001). Folhas destacadas foram mantidas em diferentes soluções de açúcares no escuro, sendo a sacarose o açúcar que induziu mais fortemente as atividades de frutosilsacarose sintases (1-SST e 6-SFT). O fato da manoheptulose, inibidor da hexoquinase, não inibir esta indução pela sacarose e da manose não induzir a atividade destas enzimas sugere, também, que a hexoquinase não está envolvida na síntese de frutanos. A indução da síntese de frutanos por trealose e maltose obtida para folhas de *H. vulgare* (Muller et al., 2000), foi verificada também em *T. aestivum* (Noel et al., 2001) . Entretanto, os autores especulam que, em *T. aestivum*, maltases e trelases atuariam hidrolisando estes dissacarídeos a glucose e que o efeito obtido corresponderia a este monossacarídeo.

Já é conhecido o envolvimento das proteínas quinases e fosfatases na regulação da expressão gênica. Desta forma, Noel et al., (2001), investigaram as funções destas enzimas na indução da síntese de frutanos em folhas de *T. aestivum*, utilizando vários inibidores específicos de suas ações. Analisando o efeito da estaurosporina ou W7 (N-6-aminohexil-5-cloro-1-naftalenosulfonamida), inibidor de proteínas quinases Ca^{2+} dependentes e antagonistas da calmodulina, respectivamente, e do ácido ocadaico, inibidor de proteínas fosfatases, estes autores observaram redução da atividade das frutosilsacarose sintases induzida pela sacarose, sugerindo o envolvimento das proteínas quinases e fosfatases na indução da síntese de frutanos por açúcares.

2.4 Papel fisiológico dos frutanos

A síntese de frutanos leva à redução dos níveis de sacarose no vacúolo da célula, prevenindo assim a retroinibição da fotossíntese (Pollock, 1986). Nos vacúolos, a concentração de frutanos pode atingir valores elevados sem que haja inibição da fotossíntese. Geralmente, os frutanos são acumulados quando o suprimento de carbono pela fotossíntese excede a demanda, atuando como reserva de energia.

Além de atuarem como compostos de reserva, os frutanos protegem as membranas celulares contra a seca (repõem água para manter a estabilidade da membrana) ou frio (diminuem o ponto de congelamento devido a alta concentração de açúcar no vacúolo), contribuindo para a mudança do potencial osmótico, e conferindo resistência às plantas a fatores ambientais desfavoráveis ao seu crescimento (Van den Ende et al., 2002).

O potencial osmótico das células é regulado por compostos osmoticamente ativos, dentre estes os frutanos que, através de ajustes nos tamanhos das cadeias, conforme discutido por Edelman & Jefford (1968), atuam como agentes crioprotetores (Kandler & Hopf, 1980).

A síntese de frutanos foi relacionada com o aumento da resistência ao estresse hídrico por Pilon-Smiths et al., (1995), após a introdução do gene Sac B, responsável pela síntese de frutanos, em *Bacillus subtilis* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), espécie que não acumula frutanos. As plantas transformadas, quando submetidas ao estresse hídrico, apresentaram taxa de crescimento maior do que as obtidas pelo tipo selvagem. Os resultados obtidos pelos autores reforçam a hipótese de que a disponibilidade de água exerce uma pressão de seleção que favorece a presença do metabolismo de frutanos em plantas.

Os frutanos conferem às plantas maior resistência às condições ambientais adversas, pois a localização vacuolar permite, além do ajuste osmótico, o

armazenamento de grandes quantidades de reservas que são rapidamente disponibilizadas (Pollock & Chatterton, 1988). Esta característica os diferencia do amido, encontrado na forma insolúvel nos plastídeos. Além disso, as enzimas do metabolismo de frutanos são menos sensíveis à inativação por baixas temperaturas do que as enzimas relacionadas ao metabolismo de amido (Van den Ende et al., 2002).

Espécies capazes de sintetizar frutanos não perdem a capacidade de sintetizar amido. *Lachenalia minima*, por exemplo, espécie endêmica do Sul da África, apresenta em seus bulbos quantidades semelhantes de frutano e amido no mesmo tecido (Orthen, 2001). Entretanto, nesta espécie, foi observado que o fornecimento de carbono e energia durante a brotação é proveniente da degradação do amido e que o acúmulo de frutanos com baixo GP e sacarose, levarou à diminuição do potencial osmótico em plantas submetidas à suspensão de regas, ressaltando a importância dos frutanos na resistência desta planta à falta de água.

2.5 Importância econômica dos frutanos

Os frutanos possuem aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A inulina de *C. intybus*, espécie cultivada em países europeus, é utilizada como aditivo de alimentos, suplemento de dieta e na fabricação de xaropes de frutose.

Na forma de frutose livre, produzida a partir da hidrólise de frutanos, apresenta papel de adoçante não calórico e dietético (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001 e referências ali contidas).

Na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS), propicia inúmeros benefícios à saúde humana. Os FOS não são digeridos pelo organismo humano, sendo considerados alimentos funcionais. No intestino estes sofrem processo de fermentação por bifidobactérias, cujo crescimento é então estimulado (Incoll & Bonnett, 1996). Os ácidos graxos de cadeias curtas, produtos deste processo

fermentativo contribuem para a redução da pressão sanguínea, de taxas de triglicérides, colesterol e glicemia (Yamasaki & Matsumoto, 1993; Roberfroid, 1993). Os FOS favorecem também a absorção de cálcio, magnésio e ferro no cólon (Roberfroid et al., 1995), a produção de vitaminas do grupo B, a redução da concentração de amônia no sangue e a restauração da flora intestinal (Gibson & Roberfroid, 1995).

A inulina na sua forma não hidrolisada é muito utilizada pela indústria alimentícia como ingrediente alimentar, devido às suas propriedades funcionais específicas, sendo de gosto suave e facilmente solúvel sob aquecimento. Pode ser misturada a diferentes produtos alimentícios, proporcionando textura e aparência desejáveis. A sua capacidade de ligar-se à água confere propriedades espessantes e possibilita o desenvolvimento de géis (Dysseler & Hoffem, 1995). A inulina aumenta a viscosidade de vários produtos, otimizando a fabricação de bebidas com baixo valor calórico, cremes com baixo ou nenhum teor de gordura, iogurtes, sorvetes, mousses, chocolates, molhos para saladas, queijos processados e produtos de panificação (Silva, 1996).

A inulina também é utilizada em testes de função renal, por não ser tóxica e nem metabolizada quando injetada na corrente sangüínea, sendo considerada a substância ideal para a determinação do ritmo de filtração glomerular (Aires, 1991). No Brasil, a inulina comercial utilizada para este fim é importada e de custo elevado, o que invalida seu uso rotineiro. Estudos realizados por Dias-Tagliacozzo et al. (1996), demonstraram a aplicabilidade da inulina extraída de *V. herbacea* para este fim.

3 ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM PLANTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY INDUZIDAS À BROTAÇÃO

Resumo

Vernonia herbacea (Asteraceae) é uma espécie perene nativa do cerrado. Apresenta órgãos subterrâneos de reserva (rizóforos) que acumulam frutanos do tipo inulina. Seu crescimento sazonal é caracterizado por brotação das gemas existentes nos rizóforos, na primavera, seguida de floração e crescimento vegetativo intenso no verão e dormência no inverno. O conteúdo de frutanos diminui durante a brotação e floração, pois este carboidrato parece ser utilizado para a regeneração dos ramos aéreos. Estudos preliminares mostraram que a FEH, responsável pela mobilização dos frutanos, apresenta atividade elevada apenas durante a brotação. No presente estudo a brotação foi induzida pela remoção dos ramos aéreos e as atividades de FEH , SST, FFT e INV foram determinadas a cada 4 dias durante um mês após a poda. As atividades da FEH, SST, FFT e INV foram calculadas pela quantidade de açúcar redutor liberado e pela produção de 1-cestose, nistose e frutose após incubação com inulina, sacarose, 1-cestose e sacarose, respectivamente. Análise dos produtos de incubação por HPAEC/PAD mostraram que o açúcar redutor formado

após incubação com inulina é a frutose. A atividade da FEH, inicialmente baixa, aumentou entre 13 e 20 dias após a poda, quando atingiu valor máximo do período experimental e voltou aos níveis semelhantes aos do início do experimento no vigésimo terceiro dia. O aumento na atividade da FEH observado entre os dias 13 e 20 após a poda coincidiu com o início da brotação dos novos ramos aéreos que ocorreu no 13º dia. A atividade da SST, alta imediatamente antes da remoção dos ramos aéreos, começou a diminuir após o terceiro dia e permaneceu baixa após o nono dia. A atividade da FFT, também elevada no início do período experimental, diminuiu gradualmente até o sexto dia, embora com flutuações até o final deste período. A atividade da INV, inicialmente baixa, apresentou aumento 9 dias após a poda, seguida de diminuição entre os 13 e 20 dias, voltando a apresentar valores semelhantes aos iniciais 23 dias após a poda. Verificou-se uma diminuição do conteúdo de fruto- oligo e -polissacarídeos nos treze primeiros dias. Os resultados mostraram que a despolimerização de frutanos e a brotação são processos concomitantes em *V. herbacea* que ocorrem naturalmente durante o ciclo fenológico e também podem ser induzidos em outras fases do ciclo, através da poda dos ramos aéreos. A FFT parece atuar junto à FEH na diminuição do tamanho das cadeias de frutanos durante a rebrota, enquanto a SST é inibida devido, possivelmente, à interrupção do fornecimento de sacarose aos rizóforos pelos órgãos aéreos.

Summary

FRUCTAN METABOLIZING ENZYMES IN PLANTS OF *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY INDUCED TO SPROUTING

Vernonia herbacea (Asteraceae) is a native species from the cerrado. Its underground organs named rhizophores accumulate fructans of the inulin type as reserve carbohydrate. The seasonal growth pattern exhibited by plants of *V. herbacea*

includes sprouting of buds from the rhizophores in spring, followed by a period of flower development and vegetative growth in summer, and dormancy in winter. The fructan content decreases during sprouting and flowering due to mobilization of this carbohydrate during the regeneration of the new shoots. Preliminary studies showed that FEH, the enzyme responsible for the mobilization of fructan, shows high activity only during sprouting. The aim of this work was to analize the activities of the enzymes of fructan metabolism, FEH, SST, FFT and invertase in rhizophores of plants induced to sprouting by defoliation. The extracts were incubated using as substrate native inulin, for FEH, sucrose, for SST, 1-kestose, for FFT and sucrose, for invertase, and the activities were calculated, respectively, by quantification of reducing sugar released and the 1-kestose, nystose and fructose produced in the incubation mixture. HPAEC/PAD analysis showed that the reducing sugar released by the action of FEH is fructose. FEH activity, initially low, increased after 13 days after defoliation, reaching its maximal values on the 20th day and returning to values similar to those of the beginning of the experiment. Sprouting of new shoots started around the 13th day. SST activity was high before the defoliation but started to decrease on the 3rd day after defoliation and remained low after the 9th day. FFT activity was high at the beginning of the experiment and decreased gradually until 6th day, exhibiting fluctuations for most of the remaining experimental period. Invertase activity was low at the beginning of the experiment, increased 9 days after defoliation and decreased on the 13th day returning to low values until the end of the period. The fructan content decreased on the 13th day coinciding with the beginning of sprouting. The results suggest that fructan depolimerization and sprouting are concomitant processes in *V. herbacea* that occur naturally during the phenological cycle; nevertheless, these processes can also be induced by defoliation during other stages of the phenological cycle. FFT seems to act together with FEH by catalyzing the decrease in fructan chain size during shoot regrowth, while SST was inhibited, possibly, due to interruption of sucrose supply to rhizophores from aerial organs.

3.1 Introdução

Vernonia herbacea é uma espécie perene, nativa do cerrado, com crescimento sazonal, que apresenta órgãos subterrâneos espessados denominados rizóforos.

Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993).

O crescimento sazonal desta espécie é marcado por um período de dormência, que coincide com o inverno, quando os órgãos aéreos desaparecem e ocorre um aumento significativo no conteúdo de frutanos. Este período é seguido pela brotação dos ramos aéreos a partir de gemas presentes nos rizóforos e pela floração, durante a qual foi observado o declínio do conteúdo de frutanos, indicando a mobilização destes compostos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento da parte aérea e desenvolvimento floral. Variações nas concentrações de frutanos em rizóforos durante o ciclo fenológico desta planta indicam um processo de síntese e despolimerização desses compostos e sugerem um papel de composto de reserva para estes carboidratos (Carvalho & Dietrich, 1993).

Frutanos são polímeros de frutose, formados pela adição de resíduos de frutose à molécula de sacarose. A primeira enzima envolvida na síntese de frutanos é a sacarose: sacarose frutosiltransferase (SST) que catalisa irreversivelmente a formação do trissacarídeo 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose; a outra enzima é a frutano : frutano frutosiltransferase (FFT), responsável pelo alongamento da cadeia de frutano, que catalisa a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. A hidrólise dos frutanos ocorre pela remoção seqüencial dos resíduos terminais de frutose por uma frutano-exohidrolase (FEH). Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose, sendo a frutose livre e a sacarose, os principais produtos de sua ação (Edelman & Jefford,1968).

Estudos preliminares realizados durante o ciclo fenológico de *V. herbacea* mostraram que a FEH apresenta atividade elevada apenas na época da brotação (Ribeiro Sobrinho et al., 1996) e que sua atividade também pode ser induzida, nos rizóforos de *V. herbacea*, em outras fases fenológicas, através da poda e rebrota de seus ramos aéreos (Asega & Carvalho, 1999).

Aumento na atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva foi relacionado à brotação de órgãos aéreos em outras espécies de Asteraceae, seja durante o ciclo normal de desenvolvimento, conforme demonstrado em *Taraxacum officinale* (Rutherford & Deacon, 1974), *Cichorium intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996b) e *Helianthus tuberosus* (Marx et al., 1997a), como durante a brotação em plantas induzidas à brotação após a retirada dos órgãos aéreos, conforme observado em *Polymnia sonchifolia* (Fukai et al.. 1997) e *C. intybus* (De Roover *et al*., 1999). Van den Ende et al., (1999a) demonstraram, em plantas jovens de *C. intybus* desfoliadas, que além do aumento da atividade da FEH, ocorreu diminuição da atividade da SST e variações na atividade da FFT durante todo o período experimental.

Como a FEH é uma enzima praticamente inativa em rizóforos de *V. herbacea* durante todas as épocas do ano, exceto na época da brotação, estudos com esta enzima são de difícil execução já que o período de brotação é bastante curto. Assim, experimentos que visem à indução da atividade desta enzima são relevantes, tendo em vista o estudo do metabolismo de frutanos e o conhecimento do papel destes compostos como carboidratos de reserva.

Em vista das informações apresentadas acima sobre o comportamento da FEH em *V. herbacea*, este trabalho teve como objetivo a análise da atividade da enzima FEH, bem como das enzimas envolvidas na biossíntese de frutanos SST e FFT e da invertase, em rizóforos de plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação por meio de remoção dos ramos aéreos. Análises do conteúdo e da composição de frutanos foram também realizadas para monitoramento destes compostos e comparação com os dados de atividade enzimática no mesmo período. Este trabalho

permitirá a ampliação dos conhecimentos sobre o controle do metabolismo de frutanos e sobre o seu papel de reserva e no desenvolvimento de plantas do cerrado.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Biológico

Para o experimento de indução de brotação foram selecionadas 30 plantas adultas de *V. herbacea* (Vell.) Rusby obtidas por propagação vegetativa a partir de rizóforos de plantas coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, SP. Estas plantas foram cultivadas em vasos individuais mantidos próximos aos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, sob condições ambientais naturais durante todo o período experimental. O experimento foi realizado no mês de dezembro, quando as plantas se encontravam em fase de crescimento vegetativo. No início do experimento as plantas foram submetidas à remoção dos ramos aéreos através de poda na altura do solo. Minutos antes da poda e a seguir, em intervalos de 4-6 dias num total de 32 dias, foram retiradas amostras de rizóforos para as extrações enzimáticas e de carboidratos, em triplicata, a partir de 3 plantas. Das três plantas selecionadas para cada dia de amostragem, 20 g de rizóforos foram retirados de cada uma para extração enzimática e 2 g para extração e análise de frutanos.

3.2.2 Extração Enzimática

Os rizóforos foram homogeneizados com homogeneizador manual em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,5, contendo 2 mM de ácido etilenodiamiinotetraacético (EDTA), 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β-mercaptoetanol e 10% (w/v) de polivinil polipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônia a 20% de saturação, sendo a mistura

mantida em repouso por 30 min. Após centrifugação a 12.000 *g* por 20 min, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônia a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora e a proteína precipitada foi coletada por centrifugação a 17.000 *g* por 20 min. O precipitado foi ressuspendido em tampão de extração, contendo sulfato de amônia a 100% de saturação. Após centrifugação a 17.000 *g* por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão de extração e mantido em geladeira por uma noite. Após centrifugação a 12.000 *g* por 15 min, o precipitado, consistindo principalmente de frutano residual, foi descartado e o sobrenadante, consistindo da preparação enzimática, foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG e congelado em freezer a -80º C até a realização dos ensaios enzimáticos. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5º C.

3.2.3 Dosagem de Proteína

Os conteúdos de proteína nos extratos enzimáticos foram estimados pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente da Bio Rad. Albumina (Sigma) de soro bovino (1mg ml^{-1}) foi utilizada como padrão.

3.2.4 Ensaio Enzimático

As misturas de incubação consistiram de extrato enzimático e solução de substrato na proporção 1:1 (v / v).

Para a análise da atividade da FEH o substrato utilizado foi inulina de *V. herbacea* na concentração final de 50 mg ml^{-1} preparada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,5. Durante as incubações, realizadas a 30 ºC, foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h e 8 horas. Em seguida, as alíquotas foram submetidas à fervura por 5 min para interrupção da reação e congeladas para posterior análise dos produtos formados.

Para a análise das atividades da SST, FFT e invertase os substratos (concentrações finais na mistura de incubação), constituídos de 0,2 M de sacarose, 0,2 M de 1-cestose e 0,05 M de sacarose, respectivamente, foram preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,5. A temperatura de incubação foi de 30 ºC e o tempo de incubação foi de 6 horas para SST e FFT e de 4 horas para invertase.

Para a análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) das atividades da FEH, SST, FFT e invertase, aliquotas das misturas de incubação foram diluídas 150, 100, 300 e 100 vezes, respectivamente, em água deionizada e filtradas em filtros de 0.45 μm (Spartan – 3, da Aldrich).

3.2.5 Análise das atividades enzimáticas

A atividade da FEH foi determinada pela quantificação da frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação de açúcar redutor, de acordo com Somogyi (1945), utilizando-se frutose (100 μg ml^{-1}), como padrão e por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300 e coluna Carbo Pac PA100 (4 x 250mm). O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de NaOH) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) com a seguinte programação : 0-4 min, 25 mM; 4-20 min, 225 mM; 20-35 min, 450 mM; 35-36 min, 500 mM; 36-41 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1ml min^{-1}.

As atividades de SST e FFT foram determinadas pela quantificação de 1-cestose e nistose formadas, respectivamente. Os produtos do ensaio enzimático foram analisados por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300 e coluna Carbo Pac PA1 (4 x 250mm), utilizando-se a seguinte programação : 0-4 min, 25 mM; 4-25 min, 225 mM; 25-27 min, 500 mM; 27-30 min, 25 mM. Os potenciais

aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1ml min^{-1}.

A atividade de invertase foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação. Os produtos do ensaio enzimático foram analisados por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300 e coluna Carbo Pac PA1 (4 x 250mm). O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (água) e eluente B (200 mM de NaOH) com a seguinte programação : 0 - 2 min, 12 mM a 24 mM; 2,1 - 5 min, 24 mM a 36 mM; 5,1 – 9 min, 36 mM a 44 mM; 9,1 – 13 min, 44 mM a 54 mM; 13,1 – 16 min, 54 mM a 62mM; 16,1 – 18 min, 62 mM a 66 mM; 18,1 – 22 min, 66 mM a 96 mM; 22,1 – 25 min, 96 mM; 25,1 – 28 min, 96 mM a 120 mM; 28,1 – 35 min, 120 mM; 35,1 – 40 min, 120 mM a 140 mM; 40,1 – 41 min, 12 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1ml min^{-1}.

As quantificações de frutose, 1-cestose e nistose foram obtidas através das áreas do picos, utilizando-se padrões externos.

3.2.6 Preparação do substrato (Extração de Inulina)

Rizóforos de *V. herbacea* foram fragmentados e as enzimas presentes no tecido foram inativadas por fervura em etanol 80% por 5 min. Em seguida foram homogeneizados em liquidificador, aquecidos em banho-maria a 80º C por 15 min e centrifugados a 700 *g* por 15 min a temperatura ambiente. O precipitado foi retomado em etanol 80% e re-extraído conforme descrito acima. Os sobrenadantes foram reunidos e reservados em câmara fria, constituindo a fração etanólica, composta primariamente de oligossacarídeos de frutanos, hexoses e sacarose. Ao precipitado da centrifugação foi adicionada água destilada, sendo a mistura aquecida em banho-maria a 60ºC por 30 min e, em seguida, filtrada a vácuo em tecido de algodão. O resíduo foi submetido a uma re-extração conforme a anterior. Os dois

filtrados foram reunidos, constituindo a fração aquosa. A fração aquosa foi clarificada pela adição de carvão ativado 1,5 % (w/v) a 70º C por 10 min, sendo em seguida filtrada a vácuo em filtro de papel, concentrada em evaporador rotatório e congelada para precipitação dos fruto-polissacarídeos. Após descongelamento, os polissacarídeos precipitados foram separados do sobrenadante por centrifugação a 1100 *g* por 15 min a 5º C. Em seguida foram congelados a –20 ºC e liofilizados. Esta fração, constituída de polissacarídeos de frutanos (inulina), foi utilizada como substrato nos ensaios enzimáticos.

3.2.7 Extração de fruto-oligo e polissacarídeos

Amostras do material fresco (2 gramas) de rizóforos foram submersas em etanol 80% em ebulição por 5 min para inativação de enzimas e maceradas em gral até homogenização completa. Em seguida os homogeneizados foram colocados em banho-maria a 80º C por 5 min e centrifugados a 700 *g* por 15 min a temperatura ambiente. Os resíduos foram re-extraídos em etanol 80% a 80º C por 5 min, centrifugados nas condições acima, e os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos. Os resíduos foram submetidos à extração aquosa em banho-maria a 60º C por 30 min. Após filtração à vácuo em tecido de algodão, os resíduos foram re-extraídos e os filtrados reunidos ao extrato etanólico. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório até pequeno volume e submetidos ao fracionamento dos fruto-oligo e -polissacarídeos por precipitação a frio com três volumes de etanol. A seguir foram centrifugados a 700 *g* por 20 min a 5º C; os precipitados foram ressuspendidos em água e constituiram as frações de fruto-polissacarídeos e os sobrenadantes, concentrados em evaporador rotatório até eliminação do etanol, constituiram a fração de fruto-oligossacarídeos.

3.2.8 Análise quantitativa dos frutanos

Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos separadamente, através do método de antrona modificado para quantificação de cetoses (Jermyn, 1956), utilizando-se frutose (100 μg ml^{-1}) como padrão.

3.2.9 Análise qualitativa dos frutanos

Cromatografia em camada delgada (CCD) - amostras de fruto-oligossacarídeos constituídas de alíquotas equivalentes de cada uma das três replicatas foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica (5 x 1 cm) contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 x 40 x 200) e aniônica (Dowex 1 x 8 – 200) segundo Carvalho & Dietrich (1993). Em seguida, quantidades desses extratos equivalentes a 100 μg de frutose foram cromatografadas em placas de silica gel de alta resolução (TLC Ready-Foils F 1500, da Schleicher & Schuell), com desenvolvimento duplo em 1-propanol : 2-butanol : água (12:3:4, v:v:v) (Kanaya et al., 1978, modificado). A revelação dos componentes presentes em cada amostra foi feita por aspersão com solução de uréia-ácido ortofosfórico (Wise et al., 1955). Utilizou-se como padrão uma mistura de oligofrutanos extraídos de tubérculos de *H. tuberosus*.

Cromatografia de troca aniônica de alta resolução dos fruto-oligossacarídeos (HPAEC/ PAD) – as amostras de fruto-oligossacarídeos deionizadas conforme descrito acima e filtradas em filtros de 0.45 μm (Spartan – 3, da Aldrich) foram analisadas na concentração de 200 μg ml^{-1} por HPAEC/PAD em coluna Carbo Pac PA100 (4 x 250mm). O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de NaOH) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) com a seguinte programação : 0-4 min, 25 mM; 4-25 min, 225 mM; 25-35 min, 320 mM; 35-38 min, 500 mM; 38-41 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para

E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1ml min^{-1}.

3.3 Resultados e Discussão

As atividades da FEH, SST, FFT e invertase foram analisadas a cada quatro dias, aproximadamente, durante os 32 dias que seguiram a remoção dos ramos aéreos, conforme mostra a figura 1.

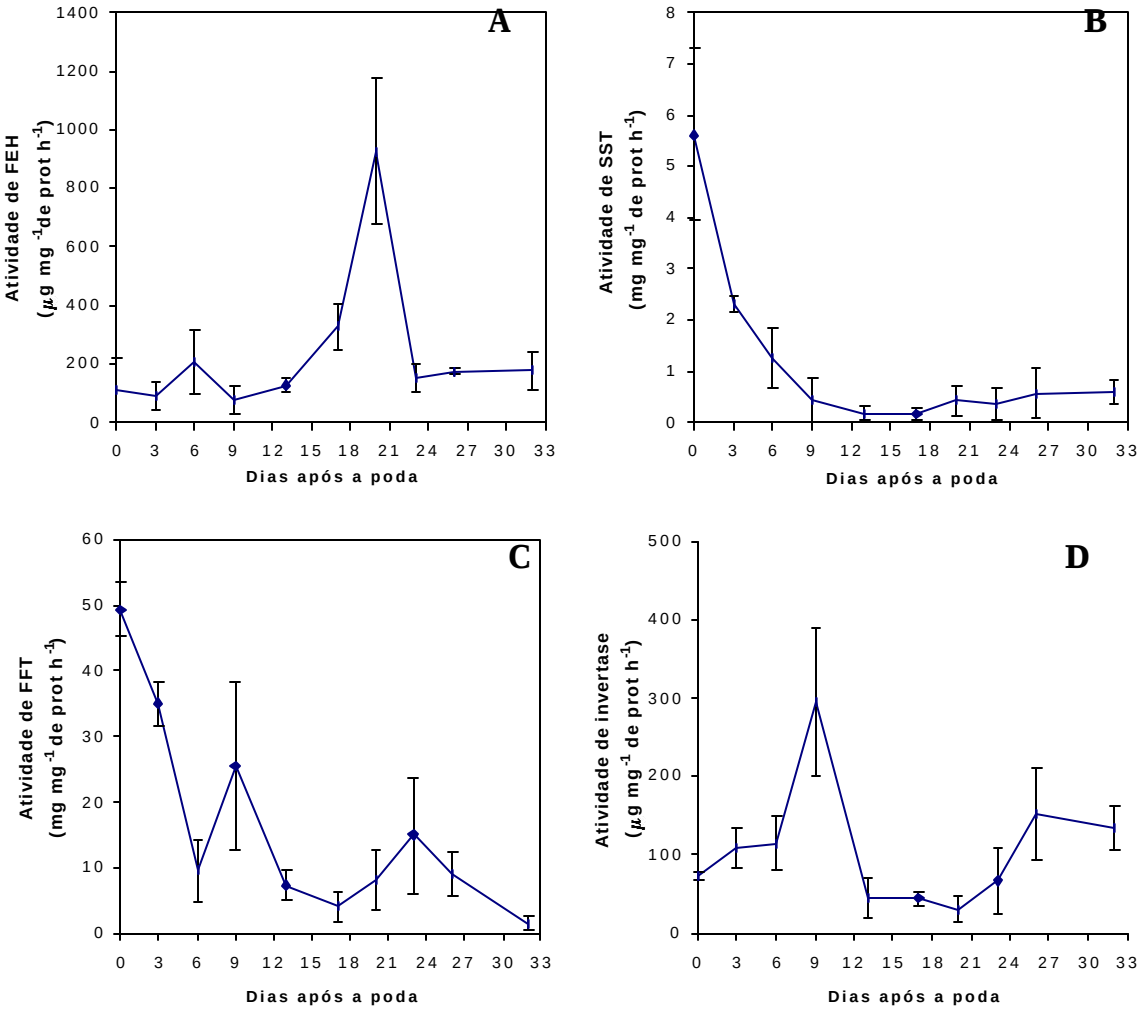

Figura 1 – Atividades específicas da FEH(A), SST (B), FFT (C) e invertase (D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à remoção dos ramos. (barras representam ± erro padrão, n = 3).

Foram verificadas variações das atividades específicas das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos e o perfil de variação foi semelhante ao obtido para a atividade total (dados não mostrados), refletindo a pequena variação no conteúdo de proteína total durante o período (figura 2).

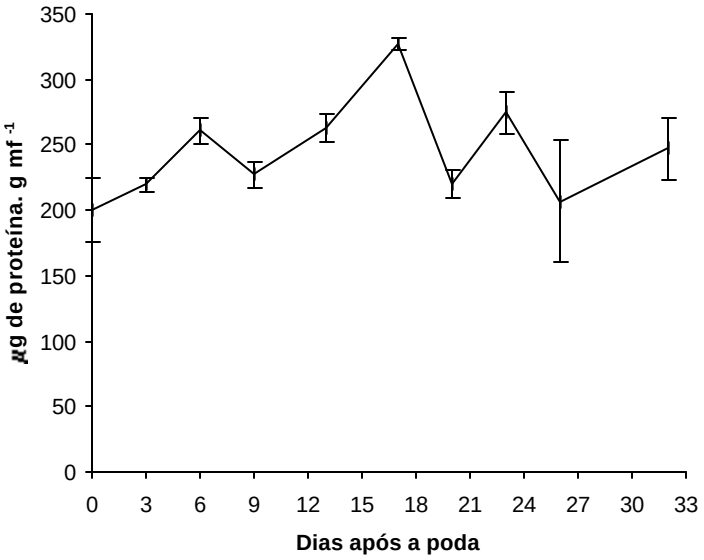

Figura 2 - Conteúdo de proteína total em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à remoção dos ramos aéreos (barras representam ± erro padrão, n = 3).

A atividade da FEH (1A) foi calculada com base na quantidade de açúcar redutor liberado durante os 30 primeiros minutos de incubação, período em que se verificou a maior taxa de atividade. Como pode ser observado, a atividade da FEH aumentou significativamente entre 13 e 20 dias após a poda dos ramos aéreos, quando esta atingiu valor máximo do período experimental. Após este período ocorreu uma diminuição da atividade (aos 23 dias) que voltou a apresentar valores semelhantes aos iniciais.

O início da brotação ocorreu aproximadamente aos 13 dias, coincidindo com o período em que teve início o aumento da atividade da FEH nos rizóforos. O

aumento significativo da atividade, entretanto, ocorreu quando os brotos originados de gemas existentes nos rizóforos já haviam despontado na superfície do solo, sugerindo que o aumento da atividade da FEH esteja associado aos processos de brotação e crescimento inicial dos ramos aéreos, induzidos pela poda.

Análises qualitativas dos produtos formados por HPAEC/PAD durante a incubação enzimática mostraram que o açúcar redutor liberado pela ação desta hidrolase é a frutose (Figura 3). A atividade de FEH 20 dias após a poda é evidenciada nesta figura pelo aumento gradual do pico referente à frutose e pelo aparecimento de picos eluídos com menor tempo de retenção, referentes a frutanos de cadeias curtas. O aparecimento destes frutanos demonstra a ação da FEH na diminuição das cadeias mais longas. Este aumento não foi verificado em incubações com preparações enzimáticas de plantas recém-podadas (tempo 0), demonstrando baixa atividade de FEH nestas plantas (figura 1A). O pico referente à glucose não sofreu alteração, confirmando que o açúcar redutor liberado durante as incubações (Figura 3) é a frutose. Os demais picos observados nos cromatogramas referem-se aos oligossacarídeos e, principalmente, polissacarídeos de frutanos constituintes do substrato utilizado. Os resultados obtidos permitem afirmar que a enzima frutano-hidrolase atua como uma exoenzima liberando resíduos de frutose da extremidade da cadeia de frutano.

Analisando a atividade da FEH em rizóforos de plantas de *V. herbacea* em várias fases fenológicas, Ribeiro Sobrinho et al. (1996), mostraram que a atividade é elevada apenas na fase de brotação das plantas, no início da primavera. Este resultado corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, que indicam que a atividade da FEH pode também ser induzida pela retirada dos ramos aéreos e conseqüente rebrota e crescimento dos novos ramos, quando a planta não se encontra em fase natural de brotação.

Um aumento na atividade da FEH na primavera, durante a fase de brotação foi detectado também em raízes de *T. officinale* por Rutherford & Deacon (1974).

Estes autores sugeriram que este aumento poderia, pelo menos em parte, estar relacionado com a redução do conteúdo de frutanos nas raízes durante esta fase. Observaram também que os níveis destes compostos voltaram ao normal no final do verão, durante a fase de crescimento vegetativo destas plantas.

Resultados semelhantes com relação ao conteúdo de frutanos foram obtidos por Carvalho & Dietrich (1993) em rizóforos de *V. herbácea:* uma queda na concentração de frutano total e um aumento de frutose livre entre as fases de brotação e floração, sugerindo a ocorrência de hidrólise de frutanos associada ao crescimento dos novos ramos e o desenvolvimento floral. Estes autores verificaram também que os níveis de frutanos nos rizóforos voltaram a aumentar no final do verão.

Fukai et al. (1997) obtiveram resultados semelhantes quando detectaram um aumento significativo das atividades total e específica da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva de *P. sonchifolia* durante a rebrota de novos ramos que sucedeu a perda da parte aérea por ação de fortes ventos sobre a plantação.

Van den Ende et al., (1999a), que também detectaram aumento da atividade da FEH em plantas jovens de *C. intybus* após a desfoliação, sugeriram que esta enzima pode ser considerada uma enzima de "sobrevivência" que pode ser induzida em outras fases fenológicas além da fase de brotação quando a demanda energética da planta aumenta.

A atividade da FEH pode ainda ser induzida pelo armazenamento no frio, como verificado em raízes adultas de *C. intybus* (Van Den Ende & Van Laere,1996b) e pelo tratamento enriquecido com nitrogênio após um longo período de deficiência de nitrogênio em raízes jovens desta mesma espécie (Van Den Ende et al., 1999b).

Muitos estudos relatam o envolvimento das giberelinas no crescimento dos novos ramos e na regulação da expressão de hidrolases durante a germinação e invertases durante o alongamento do caule. A biossíntese de giberelinas foi

relacionada com a indução da atividade da FEH após a desfoliação, em restolhos de folhas cortadas de *L. perenne*. Morvan et al., (1997) sugeriram esta relação, após aplicarem uniconazole, inibidor da biossíntese de giberelinas, que causou diminuição da atividade da FEH nas primeiras 24 horas após a desfoliação. Entretanto, mais recentemente Morvan-Bertrand et al., (2001) mostraram que os níveis deste hormônio diminuíram simultaneamente com o aumento da atividade da FEH após a desfoliação. Desta forma, estes autores acreditam ser improvável que o GA_1 esteja positivamente envolvido no controle da atividade da FEH durante a rebrota. Logo, o efeito do uniconazole previamente observado na atividade da FEH poderia ser mediado por mudanças em outros reguladores de crescimento, não em GA_1, uma vez que o uniconazole não é um inibidor específico para biossíntese de GA_1.

Figura 3.- Perfil cromatográfico (HPAEC/PAD) dos produtos formados pela FEH durante a incubação de extratos enzimáticos de rizóforos de *Vernonia herbacea* com inulina de *V. herbacea* no tempo 0 e vinte dias após a remoção dos ramos aéreos. F – frutose, Fr- frutanos da serie da inulina.

Logo após a remoção dos ramos aéreos, ocorreu uma diminuição da atividade da SST até o dia 9, seguida da manutenção de níveis baixos de atividade até o final do experimento (figura 1B). Essa queda está possivelmente associada à ausência de órgãos fotossintetizantes e, portanto, à interrupção do fornecimento de sacarose, molécula precursora dos frutanos, para o órgão dreno, no caso, o rizóforo.

Os resultados obtidos demonstram claramente que o aumento da atividade de FEH ocorre após a diminuição da atividade da SST e reforçam a hipótese do controle temporal das enzimas do metabolismo de frutanos que estão presentes no mesmo compartimento molecular, o vacúolo (Frehner et al., 1984). O aumento da atividade da FEH parece marcar a mudança temporária do caráter de órgão dreno do rizóforo (síntese de frutanos/atividade de SST) para órgão fonte (mobilização de reservas/atividade de FEH).

Esta mudança temporária do caráter de órgão dreno para órgão fonte foi observada por diversos autores. Em restolhos das folhas cortadas de *L. perenne*, a atividade da SST foi inversamente proporcional à variação de atividade da FEH e invertase durante todo o período de rebrota (Morvan et al., 1997). Em raízes de plantas jovens de *C. intybus* que sofreram desfoliação, a diminuição da atividade da 1-SST coincidiu com o aumento da atividade da 1-FEH (Van den Ende et al., 1999a) e em restolhos dos caules cortados de *Dactylis glomerata*, a atividade da fleanase (enzima que hidrolisa o frutano do tipo levano) aumentou significativamente durante os primeiros dias, e foi inversamente proporcional à concentração de levano (Yamamoto & Mino, 1987; Yamamoto & Mino, 1989).

A atividade da FFT (figura 1C), apresentou uma diminuição inicial seguida de variações que caracterizaram a atividade desta enzima durante todo o período experimental. Comportamento semelhante com relação à FFT foi observado por Van den Ende et al. (1999a) em raízes tuberosas de plantas jovens de *C. intybus* que sofreram desfoliação. Sendo a FFT uma enzima que catalisa a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma

receptora (Luscher et al., 1993; Koops & Jonker, 1994), podemos sugerir que a variação na sua atividade, em *V. herbacea* demonstra sua atuação na redução do tamanho das cadeias de frutanos, auxiliando na mobilização destes compostos para a brotação, como também no alongamento dessas cadeias quando do restabelecimento das reservas de frutanos após a brotação.

Segundo Hellwege et al., (1998) o padrão de distribuição das cadeias de inulina, assim como o máximo grau de polimerização das moléculas acumuladas nos órgãos de reserva de diferentes espécies, depende principalmente da atividade da FFT, embora o envolvimento da FEH não possa ser excluído. Esses autores relataram ainda que em algumas espécies, a FFT parece também estar envolvida na rápida diminuição do tamanho molecular médio de frutanos durante tratamento de frio em órgãos armazenadores, e que esta diminuição não foi acompanhada por diminuição líquida significativa dos carboidratos. Assim, a FFT estaria utilizando frutanos com baixo peso molecular e sacarose como aceptores de frutose.

A atividade da invertase (figura 1D), inicialmente baixa, apresentou aumento 9 dias após a poda dos ramos, seguida de diminuição entre os dias 13 e 20, voltando a apresentar valores semelhantes aos iniciais 23 dias após a poda. O pico de atividade da invertase antecedeu o pico de atividade da FEH, sugerindo que nestas plantas a mobilização de reservas ocorreu inicialmente no “pool” de sacarose e em seguida no de frutanos, para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento de seus órgãos aéreos.

Nos restolhos das folhas de *L. perenne* após desfoliação, também foi verificado o aumento das atividades da FEH e da invertase após as primeiras 26 horas (Marx et al., 1997 b) e após 48 horas (Morvan et al., 1997).

Os conteúdos de oligossacarídeos e polissacarídeos em rizóforos *V. herbacea* após a poda dos ramos diminuíram nos 13 primeiros dias, como mostra a figura 4, coincidindo com o início da brotação dos novos ramos e com a diminuição da atividade da SST. Após este período os conteúdos de frutanos aumentaram discretamente e, ao final do experimento, voltaram a níveis semelhantes aos detectados no dia 13.

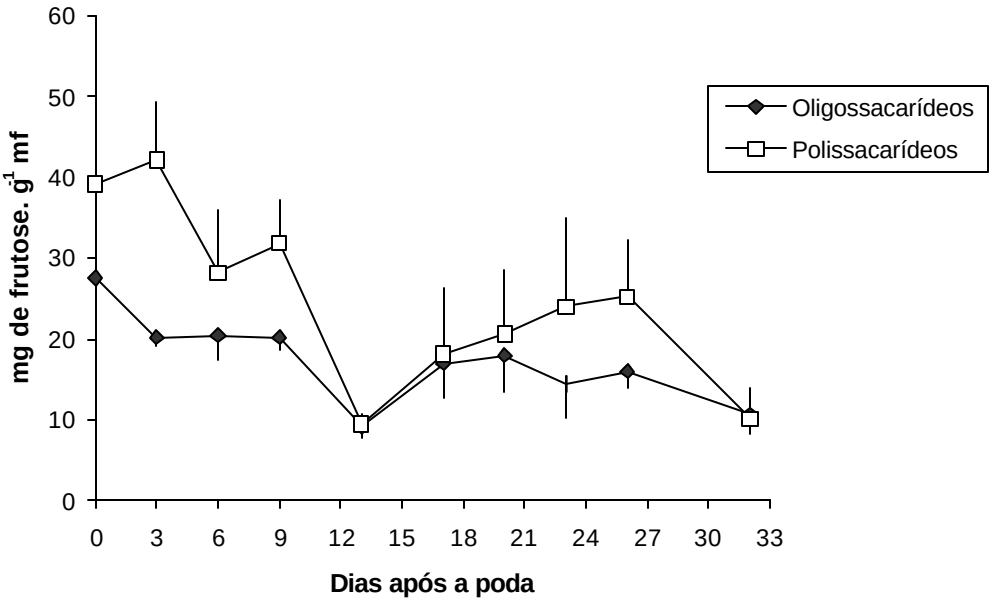

Figura 4.- Conteúdo de fruto-oligo e -polissacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à remoção dos ramos aéreos (barras representam ± erro padrão, n = 3).

Vários autores observaram não apenas o aumento da atividade da frutano-exohidrolase após a desfoliação, mas também mudanças nas concentrações de frutanos. Em *L. perenne,* nos restolhos de folhas, os frutanos de alto grau de polimerização foram hidrolisados completamente durante as primeiras seis horas

(Pavis et al., 1998) ou durante os dois dias de rebrota após a excisão das folhas (Morvan-Bertrand et al., 1999; Pavis et al., 2001); em raízes de *C. intybus*, Van den Ende et al. (1999a) verificaram uma rápida diminuição nas concentrações de hexoses, sacarose e frutano total nas primeiras 24 horas após a desfoliação e em *D. glomerata*, foi observada uma diminuição nas concentrações de sacarose e glucose nos restolhos dos caules (Yamamoto & Mino, 1987). Os resultados demonstram claramente que o processo de mobilização de frutanos pela FEH está associado à retirada das folhas nessas plantas.

Análises qualitativas das frações de oligossacarídeos por cromatografia em camada delgada são mostradas na figura 5. Além da frutose e da sacarose, todos os membros da série homóloga da inulina estão presentes em todos os extratos analisados. A partir de 6 dias após a poda, portanto, antes da detecção do aumento da atividade da FEH nos tecidos de rizóforos, observou-se um aumento na razão frutose:sacarose, devido, principalmente, ao aumento na proporção de frutose nas amostras. Estes resultados foram confirmados por HPAEC/ PAD (figura 6) que evidenciou a partir do sexto dia, o aumento da concentração de frutose e a despolimerização dos oligossacarídeos nessas amostras.

O aumento em frutose mostrado nas figuras 5 e 6 sugere o aumento da atividade “in vivo” da FEH nos rizóforos de plantas submetidas à poda dos órgãos aéreos. O pico referente à glucose não sofreu alteração, com exceção do 13º dia (figura 6), assim o aumento da atividade da invertase observado “in vitro” não pode ser confirmado por esta análise. Entretanto, este aumento no 13º dia coincidiu com o início da brotação e com a diminuição da atividade da SST e do conteúdo de oligossacarídeos e polissacarídeos nos rizóforos, indicando processo de mobilização de reservas durante a rebrota e crescimento da parte áerea.

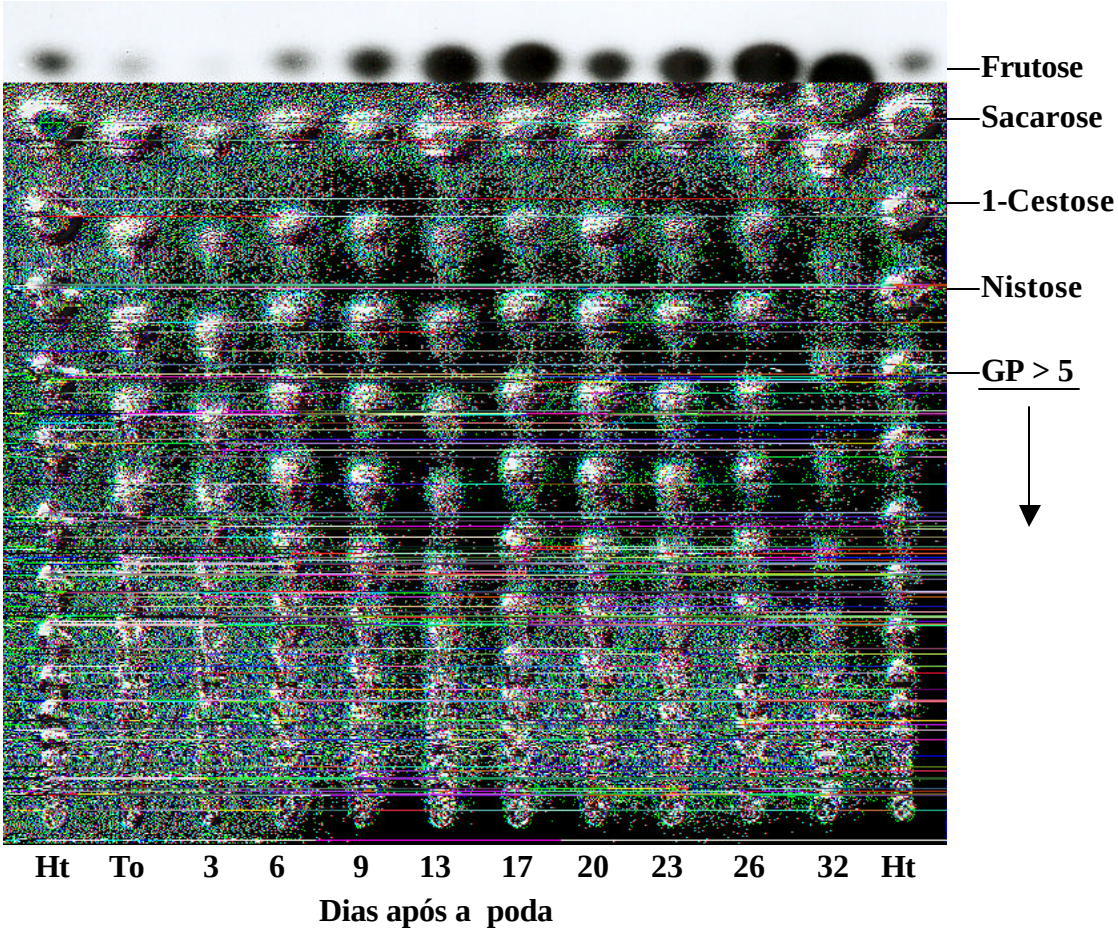

Figura 5 - Cromatografia em camada delgada de fruto-oligossacarídeos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à remoção dos ramos aéreos. Ht - fruto-oligossacarídeos de *Helianthus tuberosus,* GP - grau de polimerização.

Figura 6 - Cromatografia de troca aniônica de alta resolução do fruto-oligossacarídeos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à remoção dos ramos aéreos. F-frutose, S-sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose, os números correspondem ao grau de polimerização dos oligossacarídeos.

3.4 Conclusões

- A atividade da FEH foi induzida em rizóforos de *V. herbacea* após a remoção dos órgãos aéreos, indicando que os processos de rebrota e crescimento inicial dos ramos aéreos estão associados à despolimerização de frutanos.

- A atividade da SST foi inibida por este tratamento, devido à ausência dos órgãos fotossintetizantes e, portanto, à interrupção do fornecimento de sacarose, substrato para esta enzima, para o órgão dreno.

- A FFT parece atuar junto à FEH na mobilização de frutanos durante o processo de brotação e crescimento inicial dos ramos aéreos.

4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DE FRUTANO-EXOHIDROLASES DE RIZÓFOROS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

Resumo

Vernonia herbacea (Asteraceae) é uma espécie perene, nativa do cerrado, que apresenta crescimento sazonal. Apresenta órgãos subterrâneos, denominados rizóforos, que acumulam altas concentrações de frutanos do tipo inulina, através dos quais a planta se propaga vegetativamente. Os frutanos são polímeros de frutose que atuam como substâncias de reserva e que contribuem para a tolerância à seca e ao congelamento. Frutano exohidrolase (FEH) é a enzima responsável pela despolimerização dos frutanos, sendo a frutose o principal produto de sua ação. Atividade elevada de FEH em *V. herbacea* ocorre apenas durante a brotação ou pode ser induzida após a remoção dos órgãos fotossintetizantes, levando à mobilização dos frutanos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento de novos ramos aéreos. Este trabalho teve como objetivos a caracterização e a purificação parcial da FEH em rizóforos de *V. herbacea* induzidos à brotação. Os extratos enzimáticos foram feitos a partir de rizóforos induzidos à brotação através da poda, seguida de armazenamento dos rizóforos no frio. A atividade da FEH foi

quantificada pelo açúcar redutor liberado após incubação com inulina. Análises dos produtos de incubação por HPAEC/PAD comprovaram que o açúcar redutor liberado é a frutose. O extrato bruto apresentou, para atividade de FEH, pH ótimo de 4,5, temperatura ótima em 30 ºC e uma curva sigmoidal de concentração de substrato, sugerindo tratar-se de uma enzima alostérica. Esta enzima também apresentou maior especificidade por ligações do tipo β-2,1 do que sobre ligações β-2,6, e maior afinidade por frutanos de cadeias curtas quando comparadas com frutanos de cadeias longas. Utilizando precipitação com sulfato de amônia, cromatografia de afinidade e cromatografias de troca aniônica e catiônica, quatro frações com atividade de FEH foram purificadas. Destas quatro frações, duas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, sendo que os pesos moleculares estimados para uma delas foi de 21 kDa e para outra, esta medida situou-se entre 155 e 39 kDa, devido à ampla faixa de exclusão da coluna utilizada. Os pesos moleculares das outras duas frações foram estimados por SDS-PAGE, sendo que as bandas visualizadas corresponderam a 81,3 e 57,5 kDa para uma e 57,5 kDa para a outra fração.

Summary

PARTIAL PURIFICATION OF FRUCTAN-EXOHYDROLASE FROM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

Vernonia herbacea (Asteraceae) is a native species from the cerrado, which presents a seasonal growth pattern. Its underground organs, named rhizophores, accumulate high levels of fructans of the inulin type and are responsible for vegetative propagation. Fructans are fructose polymers that act as both, reserve carbohydrates and contributing to drought and cold resistance. The enzyme fructan

– exohydrolase (FEH) is responsible for fructan mobilization, being free fructose and sucrose the main products of its activity. FEH activity in *V. herbacea* is detected mainly during sprouting or after defoliation, leading to fructan mobilization for regeneration of new shoots. The aim of this work was the characterization and partial purification of FEH from rhizophores of *V. herbacea* induced to sprouting by defoliation and cold storage of the rhizophores. The FEH activity was calculated by quantification of reducing sugar released in the incubation mixture. HPAEC/PAD analysis showed that the reducing sugar released is fructose. The optimal pH and temperature for FEH activity were pH4,5 and 30ºC, respectively. The substrate concentration curve exhibited a sigmoid shape, suggesting that FEH of *V. herbacea* is an alosteric enzyme. Additionally, this enzyme shows more specificity to β-2,1 than to β-2,6 linked fructan, and higher affinity for short chain when compared to long chain fructans. Four fractions presenting FEH activity were partially purified by a combination of ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography, and anion and cation exchange chromatographies. Two of these were submitted to size exclusion chromatography and the apparent molecular size for one of them was 21 kDa and for the other it was estimated to be between 39 and 155 kDa, due to the wide exclusion limit of the column used. The molecular sizes of the next two fractions were estimated by SDS-PAGE and the visualized bands corresponded to 81.3 and 57.5 kDa for the first fraction and to 57.5 kDa for the second one.

4.1 Introdução

Os frutanos, diferentemente do amido, são carboidratos solúveis em água que se localizam nos vacúolos celulares (Frehner et al., 1984), embora a sua presença e a da enzima FEH, responsável pela sua degradação, tenham sido detectadas também no fluido apoplástico por Livingston & Henson (1998). Vários autores sugerem que a presença de altas concentrações de frutanos e de outros açúcares solúveis pode contribuir para a diminuição do potencial osmótico das células e, por conseguinte, promover a tolerância à seca e ao congelamento (Pontis & Del Campillo, 1985).

Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos, onde cada membro da série contém um resíduo de frutose a mais que o membro anterior (Edelman & Jefford, 1968). O frutano mais simples é um trissacarídeo, sendo conhecido três isômeros que diferem entre si pela ligação da frutose a um dis grupos hidroxila da sacarose. Na 1-cestose, o resíduo de frutose está ligado ao carbono 1 da frutose, formando α-glu-1,2-β-fru-1,2-fru, já na 6-cestose o resíduo de frutose está ligado ao carbono 6 da unidade frutose da sacarose, formando α-glu-1,2-β-fru-6,2-fru e na neocestose (β–fru-2,6-α–glu-1,2-fru) o resíduo de frutose está ligado ao carbono 6 da glucose. Os frutanos do tipo inulina, encontrados em espécies de Asteraceae, são baseados no trissacarídeo 1-cestose (Pollock et al., 1996).

O modelo mais aceito para a síntese de frutanos foi o proposto por Edleman & Jefford (1968), a partir de estudos com tubérculos de *Helianthus tuberosus*. Conforme este modelo, duas enzimas estão envolvidas: a SST (sacarose: sacarose frutosiltransferase) que catalisa irreversivelmente a formação de 1-cestose e a FFT (frutano: frutano frutosiltransferase) que catalisa a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora.

A mobilização das moléculas de frutanos ocorre pela remoção sequencial dos resíduos terminais de frutose. Segundo o modelo proposto por Edelman & Jefford (1968), recentemente confirmado por De Roover et al.(1999a), esta mobilização

pode ser catalisada pela FFT, através de ajustes nos tamanhos das cadeias e pela FEH, através da liberação de frutose livre. A FEH não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Os produtos finais desta enzima são a frutose e a sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por esta última (Edelman & Jefford, 1964). A atividade da FEH é calculada pela quantidade de frutose liberada a partir de frutanos utilizados como substrato durante a reação. O substrato utilizado para o ensaio da FEH inclui frutanos extraídos da planta da qual o extrato enzimático foi obtido (Simpson & Bonnett, 1993) bem como de outras espécies.

Por hidrólises sucessivas, grandes polímeros são convertidos irreversivelmente a uma mistura de sacarose e frutose. Como os açúcares são translocados nas plantas, principalmente sob a forma de sacarose, novamente deve haver outra conversão, desta vez, de frutose para glicose, para formar sacarose que então é translocada para fora da célula (Edelman & Jefford, 1968).

Dependendo do tipo de ligação entre os resíduos de frutose que é hidrolisada, pode-se distinguir a 1-FEH, enzima que hidrolisa ligações β-2,1, da 6-FEH, enzima que hidrolisa ligações β-2,6. Embora a FEH tenha sido caracterizada a partir de várias espécies vegetais, poucas foram purificadas até a homogeneidade eletroforética: três 1-FEH de *Cichorium intybus*, a saber 1-FEH I (Claessens et al., 1990), 1-FEH IIa e 1-FEH IIb (De Roover, et al., 1999; Van den Ende et al., 2001), uma 1-FEH de *Helianthus tuberosus* (Marx et al., 1997a), uma 6-FEH de *Lolium perenne* (Marx et al., 1997b), uma FEH de *Avena sativa*, que hidrolisa preferencialmente ligações β-2,6 (Henson & Livingston, 1996), e uma FEH de *Hordeum vulgare* que é capaz de hidrolisar tanto ligações β-2,1 quanto β-2,6 (Henson & Livingston, 1998).

Entretanto, somente três FEHs de plantas foram clonadas até o momento, todas elas de raízes tuberosas de *Cichorium intibys*: 1-FEH I (Van den Ende et al., 2000) e 1-FEH IIa e IIb (Van den Ende et al., 2001).

O aumento da atividade da FEH em plantas de *C. intybus* pode ser detectado após a desfoliação (Van den Ende et al.,1999a), pelo armazenamento no frio (Van Den Ende & Van Laere,1996) e pelo tratamento enriquecido com nitrogênio após um longo período de deficiência deste elemento (Van Den Ende et al., 1999b). Van den Ende et al., (2001), dando continuidade a esses estudos, concluíram que, em plantas desta espécie, a 1-FEH II é a enzima cuja atividade é aumentada após a desfoliação, podendo também ser induzida em outras fases fenológicas além da fase de brotação, quando a demanda energética da planta aumenta. Verificaram também que o armazenamento das plantas no frio é essencial para a indução da 1-FEH I, sugerindo que esta enzima, juntamente com a 1-FFT, atuaria de alguma forma para proteger as plantas contra os danos causados pelo congelamento. A ação conjunta destas enzimas promoveria a diminuição do tamanho das cadeias de frutanos, levando à redução do potencial osmótico das células, permitindo maior retenção de água.

Vernonia herbacea é uma espécie perene do cerrado que apresenta crescimento sazonal. Apresenta órgãos subterrâneos espessados de estrutura caulinar, denominados rizóforos, responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993).

Estudos preliminares realizados durante o ciclo fenológico mostraram que a FEH de *V. herbacea* apresenta atividade elevada apenas no curto período da brotação (Ribeiro-Sobrinho et al., 1996), dificultando a realização de estudos com esta enzima em outras épocas do ano. Os resultados reportados no capítulo anterior, mostraram que a atividade da frutano exohidrolase em rizóforos de *V. herbacea* pode ser induzida em outras fases fenológicas, além da brotação, através da poda e rebrota de seus ramos e que este aumento de atividade ocorreu entre 13 e 20 dias após a remoção dos ramos aéreos.

Verificou-se também em experimentos preliminares que a indução da atividade da FEH através da poda foi intensificada por tratamento dos rizóforos com baixa temperatura (5ºC). Assim, foram realizadas extrações enzimáticas a partir de rizóforos de plantas em fase natural de brotação e de rizóforos de plantas em fase vegetativa induzidas à brotação, através de poda dos ramos aéreos, seguidos de tratamento com baixa temperatura. Este trabalho teve como objetivos a caracterização e a purificação parcial da enzima FEH em rizóforos de *Vernonia herbacea*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Biológico

Para a purificação parcial da frutano-exohidrolase (FEH) foram utilizados rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* cultivadas sob condições ambientais naturais de campo da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu. As extrações enzimáticas foram realizadas com rizóforos de plantas em fase vegetativa induzidas à brotação. Para a indução à brotação, as plantas foram podadas na altura do solo e mantidas no solo por 17 dias; após este período, os rizóforos destas plantas foram coletados, lavados e armazenados a frio (5ºC) por 7dias.

Os extratos enzimáticos utilizados na caracterização e estudo de especificidade da FEH foram preparados de plantas induzidas, conforme descrito acima, ou de plantas em fase natural de brotação.

4.2.2 Extração e purificação das frutano-exohidrolases

Os rizóforos foram homogeneizados em liquidificador em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,5, contendo 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β-

mercaptoetanol e 10% de polivinil polipirrolidona (PVPP) (w/v). Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5º C. O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Após centrifugação a 13.000 *g* por 20 min, o precipitado, consistindo principalmente de frutano residual, foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônia a 20% de saturação, sendo a mistura mantida em repouso por uma noite. Após centrifugação a 13.000 *g* por 20 min, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônia a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por uma noite. A proteína precipitada foi coletada por centrifugação a 13.000*g* por 20 min. O precipitado foi ressuspendido em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 contendo 1 mM de cloreto de manganês, 1 mM de cloreto de magnésio e 1 mM de cloreto de cálcio e mantido em geladeira por uma noite para a precipitação de frutano residual. Após centrifugação a 5.000*g* por 15 min, o precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto, submetido à cromatografia de afinidade em coluna (15x140 mm) Concanavalina A (Con A) Sepharose (Pharmacia Biotech) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0 contendo 1mM de cloreto de manganês, 1 mM de cloreto de magnésio e 1 mM de cloreto de cálcio, com um fluxo de 3,0 ml. min^{-1}. Após a lavagem da coluna com três volumes do mesmo tampão, as proteínas ligadas foram eluidas com 1.0 M de metil α D-mano-piranosídeo em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0. As frações contendo atividade hidrolítica foram reunidas e tiveram o pH ajustado para 8.0 com tampão Tris HCl 1M, sendo em seguida aplicadas em uma coluna de troca aniônica Mono Q (Pharmacia HR 5/5), equilibrada previamente com tampão Tris HCl 20 mM, pH 8.0. As proteínas foram eluidas utilizando-se um gradiente linear de 0 a 500 mM de NaCl em 76 min (fluxo de 1 ml min^{-1}) no mesmo tampão. As frações ativas foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0 sendo realizadas três trocas. As proteínas foram aplicadas em uma coluna de troca catiônica Mono S (Pharmacia HR 5/5) equilibrada com tampão acetato de

sódio 50 mM, pH 5.0. As proteínas foram eluidas utilizando-se um gradiente linear de 0 - 500 mM de NaCl em 75 min (fluxo de 1 ml min^{-1}) no mesmo tampão. As frações com alta atividade hidrolítica foram reunidas e armazenadas a -20 ºC.

As proteínas foram mantidas no gelo durante toda as etapas da purificação. Azida de sódio foi adicionada em todos os tampões para prevenir crescimento microbiano.

4.2.3 Determinação do peso molecular

As frações da Mono S com alta atividade enzimática foram dialisadas por uma noite contra tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e cromatografadas em coluna de exclusão molecular Superose 12 (Pharmacia 10/30), equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,0, contendo 150 mM de NaCl, com um fluxo de 0,5 ml min^{-1}. A calibração da coluna foi feita com "Blue Dextran" (2.000 kDa), para determinação do volume vazio e com os padrões de massa molecular: ribonuclease (15,7 kDa), ovoalbumina (47,9 KDa), albumina de soro bovino (68,3 KDa) e aldolase (170 kDa). A massa molecular aproximada das enzimas das amostras foi calculada empregando-se a equação da reta obtida através dos volumes de eluição de cada padrão, contra os logaritmos das massas moleculares dos mesmos.

4.2.4 Conteúdo de proteína

Os conteúdos de proteína nos extratos enzimáticos foram estimados pelo método de Bradford (1976) com o reagente da Bio Rad. Albumina de soro bovina (Sigma) (1mg ml^{-1}) foi utilizada como padrão.

4.2.5 Ensaio Enzimático

Durante os diferentes passos de purificação, a atividade enzimática foi medida a partir da incubação do substrato com o extrato enzimático na proporção de 1:1 (v/v).

Para a análise da atividade da FEH, os substratos utilizados foram inulina de *H. tuberosus* (frutanos com grau de polimerização aproximado de 35) e nistose, o tetrassacarídeo da série da inulina, nas concentrações finais de 50mg ml^{-1} e 0,1M, respectivamente, ambos preparados em tampão citrato-fosfato 50mM, pH 4,5. As incubações foram realizadas a 30 ºC. Alíquotas das misturas de incubação foram submetidas à fervura por 5 min para interrupção da reação e congeladas para posterior análise dos produtos formados.

4.2.6 Análise das atividades enzimáticas

A atividade da FEH foi determinada pela quantificação da frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação de açúcar redutor, de acordo com Somogyi (1945), utilizando-se frutose (100 μg ml^{-1}) como padrão. As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo DX-300 e coluna Carbo Pac PA1. Alíquotas das misturas de incubação foram diluídas 100x em água deionizada e filtradas em filtros de 0.45 μm (Spartan – 3, da Aldrich). O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de NaOH) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH). As incubações com o substrato nistose foram analisadas com a seguinte programação : 0-2 min, 25 mM; 2,1-8 min, 50-350 mM; 8,1-13 min, 350-500 mM; 13,1-15 min, 500 mM; 15,1-17 min, 25 mM. As incubações com o substrato inulina foram analisadas com a seguinte programação: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8 min, 50-350 mM; 8,1-28 min,

350-500 mM; 28,1-30 min, 500 mM; 30,1-32 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1ml min^{-1}. O padrão de eluição do fruto-oligossacarídeos foi comparado com padrões obtidos de tubérculos de *H. tuberosus*.

4.2.7 Caracterização da frutano-exohidrolase

A caracterização da hidrolase envolvida na despolimerização de frutanos foi realizada utilizando-se extrato enzimático bruto e inulina extraída de rizóforos de *V. herbacea* como substrato.

A curva de tempo foi obtida por incubação por 0, 15, 30 min e 1, 2, 4, 6 e 8 horas, a 30 ºC. O pH ótimo foi determinado através de ensaios em tampão citrato-fosfato 50 mM e pH entre 3,5 e 7,0 a 30º C, por 4 horas e a temperatura ótima de incubação foi determinada através de ensaios realizados entre 0 e 60 ºC, pH 4,5, por 6 horas. A curva de concentração de substrato foi determinada por incubação com inulina em concentrações de 10 a 80 mg ml^{-1}, a 30º C, pH 4,5, por 18 horas.

4.2.8 Especificidade da frutano-exohidrolase sobre diferentes substratos

As incubações da FEH com substratos de diferentes graus de polimerização (GP) e com ligações β- 2,1 e β-2,6 foram realizadas utilizando-se extrato enzimático bruto. Os substratos foram preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,5 e as atividades determinadas por incubação por 0, 15, 30 min e 1, 2, 4, 6 e 8 horas, a 30º C. Utilizaram-se como substratos: sacarose, o trissacarídeo 1-cestose, o tetrassacarídeo nistose nas concentrações finais de 100 mM, inulinas (ligações β-2,1 entre os resíduos de frutose) de *H. tuberosus* (Sigma), *V. herbacea* e *V. discolor* nas

concentrações finais de 50 mg ml^{-1} e levano (ligações β–2,6 entre os resíduos de frutose) de *G. macrocephala* na concentração final de 33 mg ml^{-1}, estas últimas extraídas e purificadas no laboratório da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

4.2.9 Análise das proteínas purificadas

As análises qualitativas das proteínas foram efetuadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS – PAGE), empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970) e utilizando géis com 10% de poliacrilamida em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3, contendo 0,1% de dodecil sulfato se sódio (SDS). Foram utilizados mini-géis (9X6 cm) de 0,75 mm de espessura, montados em cuba vertical de eletroforese modelo mini-protean (Bio-Rad). Como marcadores de massa molecular foram utilizados fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisosima (14,4 kDa), todos integrantes do conjunto para calibração de baixo peso molecular da Bio-Rad. Os géis foram fixados em uma solução de 30% de ácido acético e 10% de metanol e lavados três vezes com água deionizada. Em seguida adicionou-se solução de nitrato de prata e deixou-se em repouso por 30 min sob agitação. Os géis foram lavados rapidamente com água deionizada e em seguida foi adicionada uma solução de 2,5% de carbonato de prata contendo 0,02% de formaldeido. Os géis foram agitados até que as bandas ficaram suficientemente nítidas, interrompendo-se a revelação imediatamente pela adição de ácido acético 5%.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Determinação das condições ótimas para ensaio da atividade da FEH

A caracterização enzimática é uma etapa importante para o estudo de uma enzima, pois estabelece as condições ótimas que permitem a obtenção de sua máxima eficiência.

Preparações enzimáticas, em estado bruto, feitas a partir de rizóforos de *V. herbacea* foram utilizadas para determinar as condições ideais de ensaio de atividade da FEH e mostraram atividade ótima em temperatura de 30 ºC (figura 1A) e pH entre 4.5 e 5.0 (figura 1B). A curva de concentração de substrato foi determinada por incubação com inulina (figura 1C) e demonstra um aumento da atividade entre as concentrações de 10 e 80 mg. ml^{-1}, exibindo uma curva sigmoidal de saturação nesta faixa de concentração de substrato.

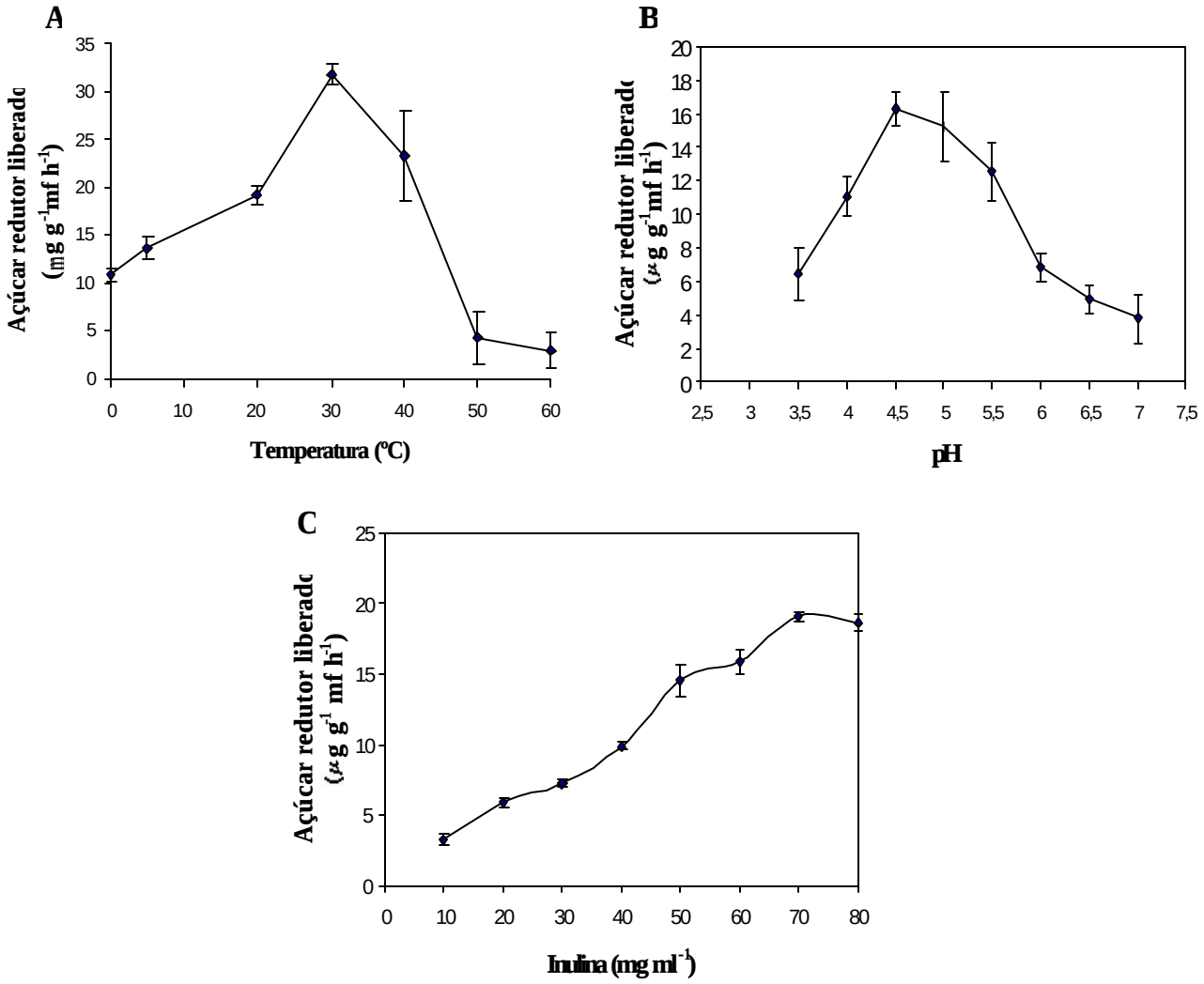

Figura 1 – Caracterização da atividade da FEH em rizóforos de *Vernonia herbacea*. Efeito da temperatura (A), pH (B), e concentração de substrato (C) (barras representam ± erro padrão, n = 3).

A curva de tempo foi obtida por incubação por 0, 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 6 e 8 horas, a 30 ºC. Analisando-se a atividade da FEH nos diferentes tempos de incubação, a maior taxa de atividade da enzima foi observada aos 30 minutos, conforme mostra a figura 2.

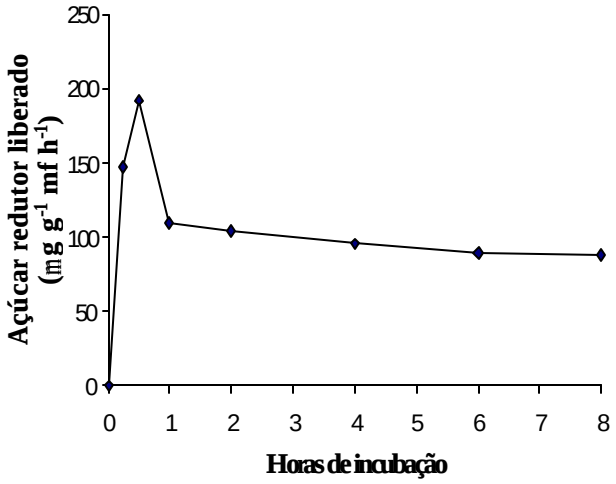

Figura 2 - Efeito do tempo de incubação na atividade da FEH de rizóforos de *Vernonia herbacea*, utilizando-se inulina da mesma espécie como substrato. Atividade calculada com base na quantidade de açúcar redutor liberado durante a incubação em pH 4,5, a 30 ºC.

O pH ótimo determinado para a FEH de rizóforos de *V. herbacea* difere dos obtidos por Wagner & Wiemken (1986) em folhas de *Hordeum vulgare* (pH 5,2), Cairns et al. (1997) em folhas de *Lolium temulentum* (pH 5,5), Marx et al. (1997a) em tubérculos de *H. tuberosus* (pH 5.2), Marx et al. (1997b) em folhas de *L. perenne* (pH 5.1-5.6), Degasperi (1998) em raízes tuberosas de *V. discolor* (pH 5.4) e De Roover et al. (1999a) em raízes de *C. intybus* (pH 5.0-5.5 para a 1-FEH II).

Entretanto, o resultado assemelha-se aos apresentados por Simpson & Bonnett (1993) em sua revisão sobre FEH em gramíneas, em que a maior atividade desta enzima ocorre entre os pHs 5,5 e 6,0 para extratos parcialmente purificados, e entre 4,5 e 5,5 extratos brutos. Estes autores também relataram que a temperatura ótima

para o ensaio da atividade da FEH situa-se entre 30 e 40 ºC, para preparações parcialmente purificadas, e entre 25 e 35 ºC, para preparações em estado bruto.

A cinética da enzima não mostrou relação com a cinética de Michaelis-Menten, já que a curva de concentração de substrato apresentou uma forma sigmoidal, sugerindo que a FEH de *V. herbacea* é uma enzima alostérica. Em enzimas alostéricas, os sítios de ligação ao substrato são múltiplos e situam-se em subunidades protéicas específicas e a ligação de uma molécula de substrato facilita a ligação da próxima molécula de substrato pelo aumento das afinidades dos sítios de ligação vazios. A resposta sigmoidal fornece um controle muito mais sensível da velocidade da reação à variação da concentração de substrato. A resposta alostérica é, em geral, bastante compreensível em termos de controle metabólico e economia celular, uma vez que, através desta, ocorre a retroinibição da primeira de uma seqüência de reações pelo último produto formado (Segel, 1979).

Resultados semelhantes aos da curva de concentração de substrato da FEH de *V. herbacea* foram obtidos por Degasperi (1998) em raízes tuberosas de *V. discolor*. Os resultados obtidos por esta autora foram compatíveis com a equação de Hill e indicaram um cooperativismo muito forte.

4.3.2 Especificidade da FEH sobre diferentes substratos

A figura 3 mostra a atividade do extrato enzimático sobre diferentes substratos. A atividade sobre a sacarose foi a mais elevada, atingindo valor máximo a partir de 4 horas de incubação, indicando alta atividade invertásica na preparação. A atividade hidrolítica sobre a 1-cestose foi superior à atividade sobre a nistose. As atividades hidrolíticas sobre estes dois substratos de cadeias curtas foram mais elevadas do que sobre as inulinas e sobre o levano. Por outro lado, comparando-se os dois últimos substratos, verificou-se que a atividade hidrolítica foi maior sobre as ligações do tipo β 2,1 encontradas em inulinas de *V. herbacea*, *H. tuberosus* e *V. discolor* do que sobre ligações do tipo β 2,6 características do levano de *G. macrocephala*.

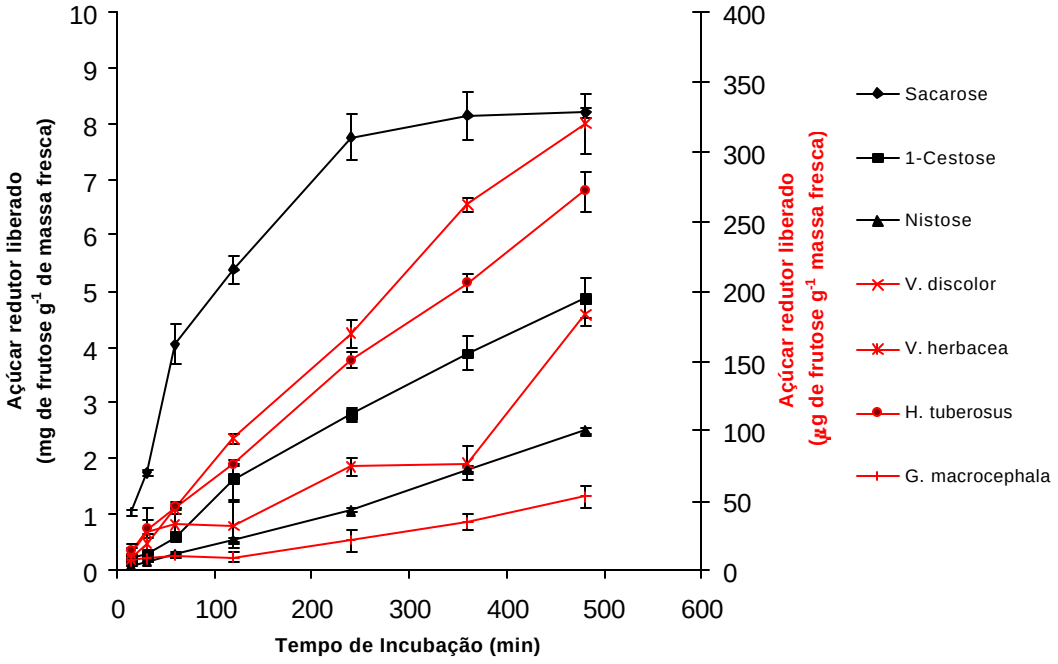

Figura 3 – Atividade da frutano-exohidrolase em rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes substratos (barras representam ± erro padrão, n = 3).

As frutano-exohidrolases, assim como a maioria das enzimas, apresentam especifidade por seus susbtratos; a 1-FEH hidrolisa preferencialmente ligações do tipo β 2,1 e a 6-FEH, ligações do tipo β 2,6. Em *V. herbacea* a hidrólise de frutanos ocorre pela ação de uma 1-FEH, conforme indicam os resultados da figura 3, coerente com o fato da inulina ser o frutano produzido por esta espécie.

Outra característica observada para a 1-FEH de *V. herbacea* foi a maior afinidade por moléculas menores (GP ~ 35) como as inulinas de *V. herbacea* e *H. tuberosus* (43,72 μg de aç. redutor g^{-1} massa fresca h^{1} e 34,32 μg de aç. redutor g^{-1} massa fresca h^{1}, respectivamente) do que sobre frutanos de cadeias longas (GP ≤ 150) como de *V. discolor* (11,08 μg de aç. redutor g^{-1} massa fresca h^{1}), conforme calculado para as primeiras seis horas de incubação.

A baixa atividade hidrolítica encontrada sobre o frutano de *G. macrocephala* neste trabalho (5,66 μg de aç. redutor g^{-1} massa fresca h^{-1}, calculado para as primeiras seis horas) pode ser decorrente do baixo índice de quebra de ligações β-2,6, predominante nestas moléculas, e da quebra de poucas ligações β-2,1 que podem ocorrer nos frutanos desta planta, conforme demonstrado por Shiomi et al. (1996).

Degasperi (1998) observou que a FEH de raízes tuberosas de *V. discolor*, apresenta maior afinidade por oligossacarídeos como nistose e 1-cestose do que por inulina da própria planta.

A alta espeficidade da FEH pelo frutano produzido pela própria espécie, verificada para a 1-FEH de rizóforos de *V. herbacea*, também foi observada para diversas espécies. Marx et al (1997b) relataram que preparações enzimáticas feitas a partir de folhas de *L. perenne*, espécie que acumula frutanos com ligações do tipo β 2,6, hidrolisaram oligossacarídeos da série da inulina como 1-cestose e 1-nistose com aproximadamente um quinto da eficiência com que hidrolisaram 6-cestose ou 6-nistose. Marx et al (1997a) observaram que a FEH de tubérculos de *H. tuberosus*

apresenta alta especificidade por frutanos com ligações do tipo β 2,1, característicos desta espécie. Semelhentemente, De Roover et al. (1999b) relataram que a 1-FEH II purificada a partir de raízes de *C. intybus*, hidrolisou ligações do tipo β 2,1 de inulina, 1-cestose e nistose cinco vezes mais rápido do que ligações do tipo β 2,6 de oligossacarídeos da série de levano. Henson & Livingston (1996) relataram que a FEH purificada de *Avena sativa* hidrolisa dez vezes mais rapidamente frutanos com ligações β-2,6, característicos desta espécie, do que frutanos que apresentam ligações β-2,1. Bonnett & Simpson (1995) separaram e purificaram parcialmente cinco atividades de frutano-exohidrolase de folhas e caules de *L. rigidium* e concluíram que três hidrolisaram ligações β-2,6 mais rapidamente do que ligações β-2,1 e as outras duas hidrolisaram, ligações β–2,1 mais rapidamente do que β–2,6.

4.3.3 Purificação Parcial da frutano exohidrolase (FEH)

O conhecimento da biologia molecular de enzimas depende do seu isolamento e purificação até a homogeneidade. Um alto grau de purificação é necessário para que sejam realizados estudos de estrutura química e de cinética enzimática, que têm como objetivo elucidar o mecanismo molecular de ação destas enzimas (Rhodes, 1977).

Segundo Itaya (2002), as técnicas utilizadas para a purificação das enzimas do metabolismo de frutanos são semelhantes e incluem a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica, de afinidade, interação hidrofóbica e filtração em gel (exclusão molecular) e a ordem com que as técnicas são utilizadas difere de acordo com as características da proteína a ser purificada.

Para a purificação da 1-FEH foram realizadas extrações enzimáticas a partir de rizóforos de plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação. A indução foi realizada através da poda e conseqüente rebrota dos órgãos aéreos, seguida de armazenamento dos rizóforos no frio. Durante todas as etapas de purificação, a atividade enzimática e o conteúdo de proteína foram determinados para avaliar a eficiência da purificação.

Os métodos de purificação consistiram de precipitação com sulfato de amônio (20-80%), cromatografia de afinidade (concanavalina A) e cromatografias de troca aniônica (Mono Q) e catiônica (Mono S).

Como mostra a figura 4, as proteínas que apresentaram atividade hidrolítica sobre inulina e nistose ficaram retidas na coluna Con A e foram eluídas com metil α D-mano-piranosideo, demonstrando que a FEH é uma glicoproteína. Segundo Simpson & Bonnett (1993) as FEHs extraídas de inúmeras espécies ligam-se à concanavalina A, sendo consideradas glicoproteínas. Isso e o pH ácido ótimo para a atividade da FEH, que é 4,5, dão suporte à hipótese da localização vacuolar para esta

enzima. Em relação à atividade enzimática, o extrato apresentou maior atividade sobre o substrato nistose do que sobre inulina.

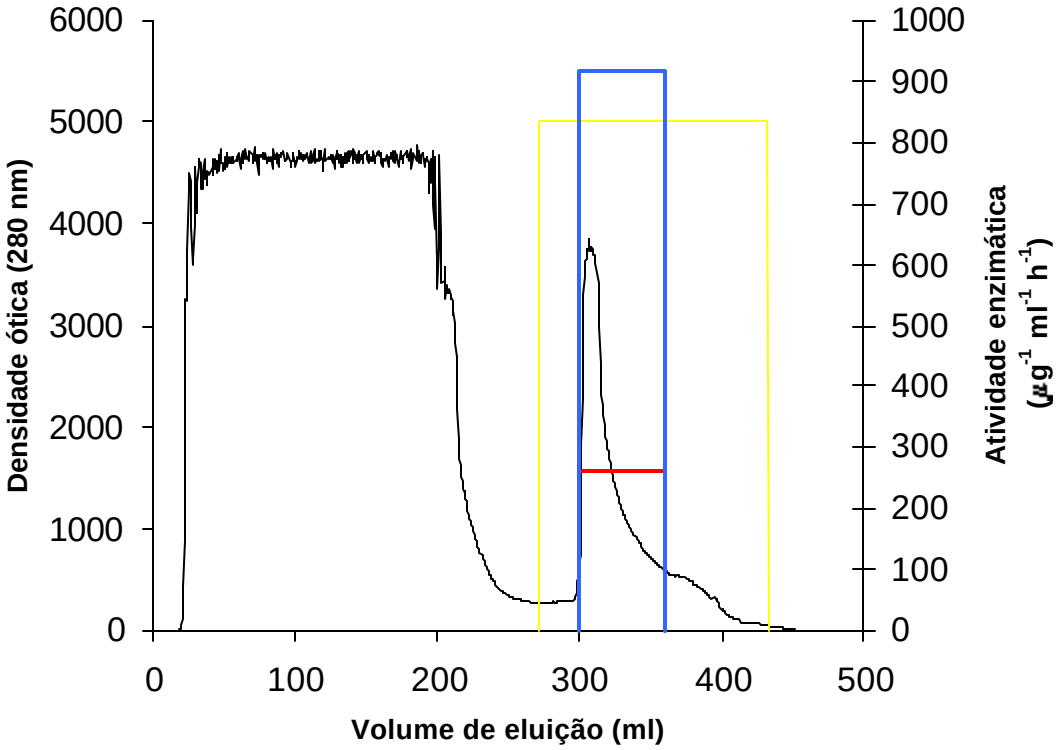

Figura 4 - Cromatografia de afinidade em concanavalina A dos extratos enzimáticos de rizóforos de *Vernonia herbacea*. A absorbância foi monitorada a 280 nm (¾). As proteínas retidas foram eluídas com 1M de metil α D-mano-piranosídeo em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (¾). Atividade total sobre inulina (¾) e sobre nistose (¾).

As frações contendo atividade hidrolítica foram reunidas e aplicadas em coluna de troca aniônica Mono Q (figura 5).

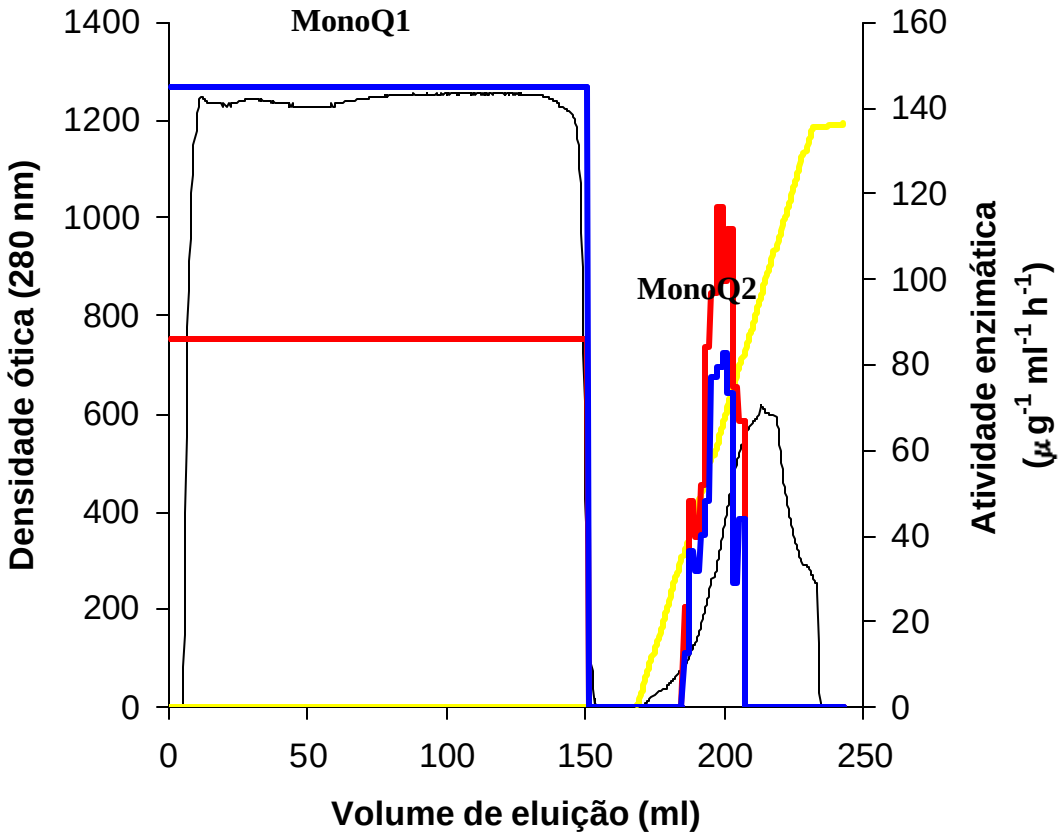

Figura 5 - Cromatografia de troca aniônica em Mono Q do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea*. A absorbância foi monitorada a 280 nm (¾). As proteínas retidas foram eluídas em um gradiente linear crescente de concentração de 0 a 500 mM de NaCl em tampão Tris HCl 20 mM, pH 8.0 (¾). Atividade total sobre inulina (¾) e sobre nistose (¾).

A figura 5 mostra o perfil do extrato enzimático em cromatografia de troca aniônica em Mono Q. Foram obtidas duas frações ativas: as proteínas eluídas antes do gradiente de concentração (MonoQ1), que apresentaram maior atividade sobre

nistose do que sobre a inulina, e as proteínas eluídas no gradiente de NaCl (MonoQ2), que apresentaram maior atividade sobre inulina do que sobre nistose.

As frações ativas Mono Q1 e Mono Q2 foram aplicadas separadamente em uma coluna de troca catiônica Mono S, equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0. As proteínas foram eluídas através de um gradiente linear de 0 – 500 mM de NaCl no mesmo tampão.

Os perfis cromatográficos das frações MonoQ1 e MonoQ2 de plantas induzidas submetidas à cromatografia de troca catiônica (Mono S) são mostrados na figura 6.

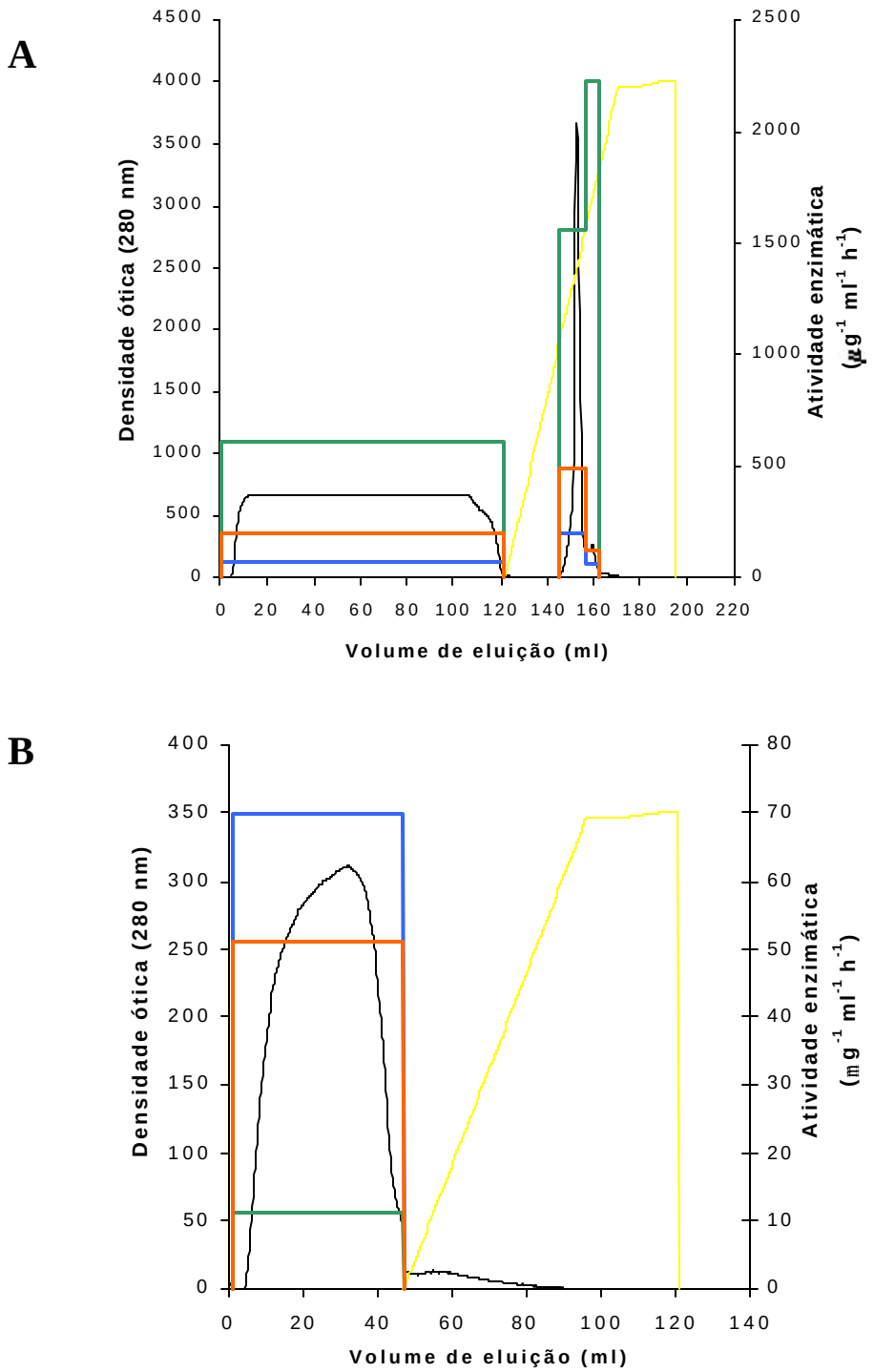

Figura 6 - Cromatografia troca catiônica em Mono S. (A) Fração MonoQ1, (B) Fração MonoQ2. A absorbância foi monitorada a 280 nm (¾) . As proteínas retidas foram eluídas em um gradiente linear crescente de concentração de 0 a 500 mM de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0 (¾). Atividade total sobre inulina (¾), nistose (¾) e sacarose (¾).

A fração MonoQ1 (Figura 6A), quando submetida à coluna de troca catiônica, apresentou três frações ativas: as proteínas eluídas antes do gradiente, denominada fração A, que apresentou maior atividade sobre inulina do que sobre nistose, além de uma alta atividade invertásica e os outros dois picos, denominados B1 e B2 de proteínas eluídas no gradiente de NaCl. Os picos B1 e B2 apresentaram maior atividade sobre inulina do que sobre nistose; em B1 a atividade sobre inulina foi maior do que em B2, entretanto, o B2 apresentou maior atividade invertásica do que o B1. A análise destas frações em SDS-PAGE pode ser visualizada na figura 10.

A fração MonoQ2, quando submetidas à coluna de troca catiônica, apresentou apenas uma fração que consistiu de proteínas eluídas antes do gradiente de NaCl, denominada fração C (Figura 6B), com maior atividade sobre nistose do que sobre inulina e baixa atividade invertásica. Esta etapa de purificação não foi eficiente para a purificação desta fração, pois além das proteínas não serem retidas pela matriz da coluna, perderam a alta atividade sobre a inulina observada para a mesma fração em etapa de purificação anterior (MonoQ2). Estas condições de pH favoreceram a detecção de enzimas que apresentaram maior atividade sobre nistose. Este resultado nos leva a sugerir que para uma melhor purificação da fração C seria necessário um ajuste no pH utilizado para equilibrar a coluna de troca catiônica.

O pH 5,0 também foi utilizado nesta etapa de purificação para as FEHs purificadas das raízes tuberosas de *C. intybus* (De Roover et al., 1999b, Van den Ende et al., 2001). Entretanto, a purificação das FEHs de raízes tuberosas e rizóforos de *Polymnia sonchifolia* e de raízes tuberosas de *V. discolor* (Itaya, 2002) só pode ser obtida utilizando-se, em coluna de troca catiônica, um pH mais ácido.

Os produtos formados durante a incubação das frações A; B1, B2; e C com os substratos sacarose, nistose e inulina foram analisados em HPAEC/PAD e são apresentados nas figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

As incubações com inulina produziram somente frutose livre, confirmando mais uma vez que a enzima frutano-hidrolase de *V. herbacea* atua como uma exoenzima liberando resíduos de frutose da extremidade da cadeia de frutano (ver Capítulo 1).

Nas incubações das frações A e B1 com nistose foram detectados traços de um membro da série homóloga da inulina (GP5), produto das enzimas de síntese de frutanos, entretanto, observam-se claramente a frutose e o trissacarídeo 1-cestose como produtos da ação da FEH sobre o tetrassacarídeo (Figura 7C, D e 8D, E).

Quando incubadas com sacarose, as frações A, B1 e B2 produziram grandes quantidades de glucose e frutose, indicando alta atividade invertásica. Observa-se ainda, nas incubações das frações A, B1 e B2, traços do trissacarídeo 1-cestose, indicando atividade de síntese nestas frações (figura 7 A, B e 8 A, B, C). A síntese de 1-cestose por invertases foi verificada por Van den Ende & Van Laere (1993). Estes autores purificaram uma enzima de raízes tuberosas de *C. intybus* que, em baixas concentrações de sacarose, comportou-se como invertase, produzindo glucose e frutose em concentrações equimolares, e que em concentrações mais altas de sacarose, produziu 1-cestose. Resultados semelhantes foram obtidos por Obenland et al. (1993) que purificou invertases de folhas de *H. vulgare* capazes de sintetizar 1-cestose, quando incubadas com altas concentrações de sacarose.

Todas as frações parcialmente purificadas apresentaram atividade de FEH e de invertase. Segundo Van den Ende et al., (2002), FEHs verdadeiras são capazes de degradar somente frutanos, enquanto que as β-frutofuranosidases podem degradar tanto sacarose como frutanos. Sendo assim, os autores acreditam que as FEHs de plantas não poderiam ser classificadas como β-frutofuranosidases. A presença dessas β-frutofuranosidases em plantas ainda não foi bem esclarecida, dessa forma, acredita-se que em alguns casos, a proteína purificada poderia ser uma mistura de

invertase e de frutano-exohidrolase, conforme sugeriram Simpson & Bonnett (1993) em sua revisão sobre FEH de gramíneas.

Figura 7 - Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados durante incubações da fração A com os substratos sacarose (¾), nistose (¾) e inulina(¾). G, F, S, 1-C, N e 5 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização 5, respectivamente.

Figura 8 - Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados durante incubações das frações B1 e B2 com os substratos sacarose (¾), nistose (¾) e inulina(¾). G, F, S, 1-C, N e 5 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização 5, respectivamente.

Figura 9 - Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados durante incubação da fração C com os substratos sacarose (¾), nistose (¾) e inulina(¾). G, F, S, 1-C e N correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente.

Utilizando precipitação com sulfato de amônio (20-80%), cromatografia de afinidade (concanavalina A) e cromatografias de troca aniônica e catiônica, foi possível separar diferentes FEHs de rizóforos de *V. herbacea*, podendo-se distinguir quatro frações com atividade de FEHs em rizóforos de plantas induzidas.

A presença de isoformas de FEH foi documentada para algumas espécies como *H. tuberosus* (Edelman & Jefford, 1964), *C. intybus* (Claessens et al., 1990), *Lolium temulentum* (Simpson et al., 1991) e *L. rigidum* (Bonnett & Simpson, 1993).

Van den Ende et al. (2001) detectaram duas FEHs em raízes de *C. intybus* e verificaram que a 1-FEH II, e não a 1-FEH I, é a enzima responsável pela atividade hidrolítica após a desfoliação das plantas. Os autores sugeriram que a 1-FEH I atua na proteção contra os danos causados pelo congelamento e que a 1-FEH II é uma enzima de sobrevivência que pode ser induzida em qualquer estádio fenológico ou quando a demanda de energia aumenta, no caso de períodos onde é necessário um rápido crescimento, como por exemplo, durante a rebrota, floração ou após qualquer dano físico ao aparato fotossintético.

Na figura 10 são apresentados os resultados da eletroforese (SDS-PAGE) das frações A, C, B1 e B2. Pode-se visualizar diversas bandas nas frações A e C, o que indica, portanto, uma purificação parcial das proteínas enzimáticas através das etapas utilizadas; entretanto na fração B1 pode-se visualizar somente duas bandas: uma de 81,3 kDa e outra de 57,5 kDa e na fração B2 uma única banda de 57,5 kDa.

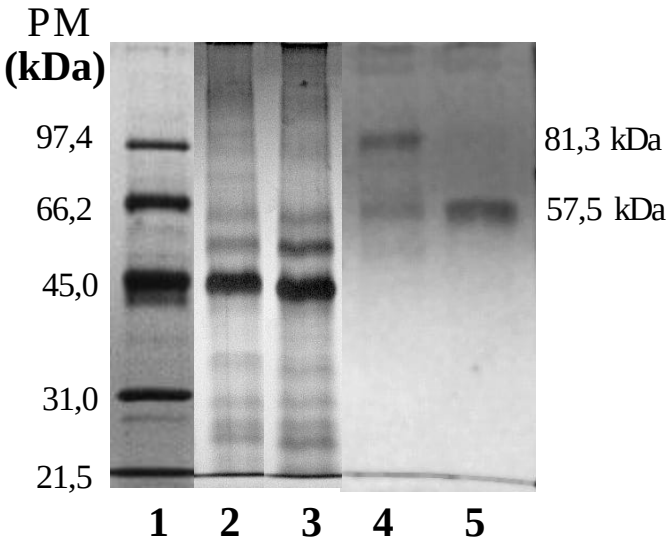

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram visualizadas por incorporação de prata. Nas canaletas 2- 5 foram aplicados, respectivamente, 2ug das frações A, C, B1 e B2 da Mono S. Os marcadores de peso molecular são apresentados em 1.

Os valores de peso molecular aparente das FEHs purificadas de *V. herbacea* encontram-se dentro da faixa dos valores encontrados para outras FEHs purificadas de outras espécies, tais como : as 1-FEHs de *C. intybus* com peso molecular entre 68-72 kDa para a 1-FEH I (Claessens et al., 1990) e 64 kDa para a 1-FEH II (De Roover, et al., 1999; Van den Ende et al., 2001), a FEH de *H. tuberosus* com peso molecular de 79 kDa (Marx et al., 1997a), a de *L. perenne*, com 69 kDa (Marx et al., 1997b), a de *Avena sativa* que hidrolisa preferencialmente ligações β-2,6, com 43 kDa (Henson & Livingston, 1996). Todos estes valores foram estimados por SDS-PAGE. Já a 6-FEH de *Dactylis glomerata* com 57 kDa, teve seu peso estimado por cromatografia de exclusão molecular (Yamamoto & Mino, 1985).

As frações A e C foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (Superose 12) previamente calibrada com "Blue Dextran" (2.000 kDa) para determinação do volume vazio e com diferentes padrões de peso molecular (Figura 11).

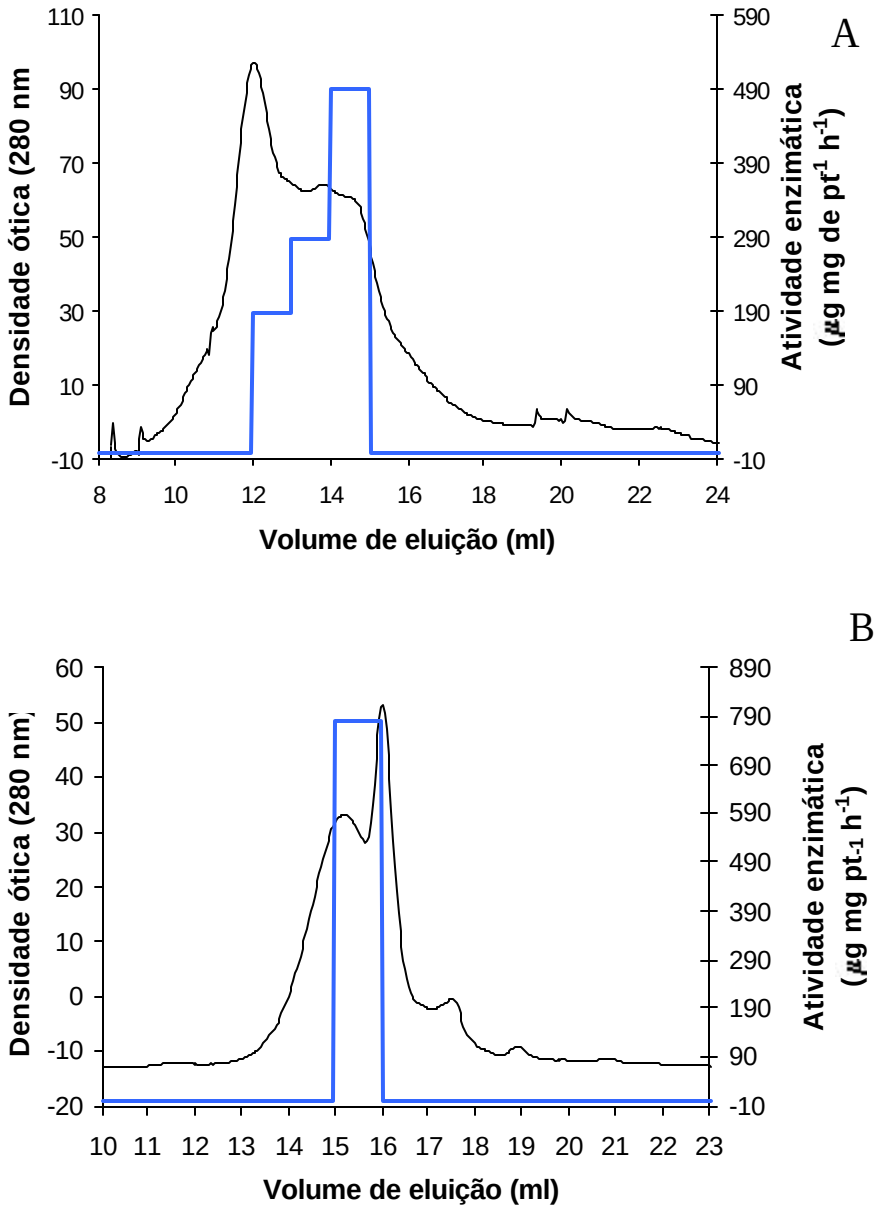

Figura 11 - Cromatografia de exclusão molecular. (A) Fração A e (B) fração C. A absorbância foi monitorada a 280 nm (—). Atividade específica sobre nistose (—).

Na fração A (figura 11A) foi verificada atividade sobre nistose nas frações 12, 13 e 14, que correspondem aos pesos moleculares de 155, 74 e 39kDa, respectivamente, e na fração C (figura 11B) somente na fração 15, que corresponde ao peso molecular de 21kDa .

Os resultados da purificação são apresentados nas tabelas 1 e 2. A máxima purificação foi a obtida na fração MonoQ2. Obteve-se um fator de purificação de 79,54 vezes, utilizando o substrato inulina de *H. tuberosus* e de 12,34 vezes, utilizando o substrato nistose.

Tabela 1. Purificação de FEH de rizóforos de *V. herbacea* induzidos à brotação. Atividade enzimática determinada sobre inulina de *H. tuberosus*.

Frações	Proteína total mg de proteína	Atividade Total mg de produto h-1	Atividade específica mg mg-1 de pt h-1	Fator de Purificação	Rendimento %
$(NH4)_2 SO_4$ 20-80 %	379,08	71,68	0,19	1,00	100,00
Con A	32,23	16,30	0,51	2,67	22,74
Mono Q 1	28,37	3,09	0,11	0,58	4,31
Mono Q 2	0,45	6,82	15,04	79,54	9,52
Fração C	2,07	2,09	1,01	5,34	2,91
Fração A	19,60	20,34	1,04	5,49	28,37
Fração B1	1,34	1,78	1,32	6,99	2,48
Fração B2	0,38	0,21	0,55	2,92	0,29

Tabela 2. Purificação de FEH de rizóforos de *V. herbacea* induzidos à brotação. Atividade enzimática determinada sobre o tetrassacarídeo nistose.

Frações	Proteína total mg de proteína	Atividade Total mg de produto h-1	Atividade específica mg mg-1 de pt h-1	Fator de Purificação	Rendimento %
$(NH4)_2 SO_4$ 20-80 %	379,08	316,00	0,83	1,00	100,00
Con A	32,23	56,76	1,76	2,11	17,96
Mono Q 1	28,37	5,21	0,18	0,22	1,65
Mono Q 2	0,45	4,66	10,28	12,34	1,48
Fração C	2,07	2,87	1,39	1,66	0,91
Fração A	19,60	7,52	0,38	0,46	2,38
Fração B1	1,34	0,71	0,53	0,64	0,23
Fração B2	0,38	0,12	0,32	0,38	0,04

Os resultados da purificação de FEH reportados para outras espécies foram de 10 vezes para *L. perenne* (Marx et al., 1997b), 41 vezes para *H. tuberosus* (Marx et al., 1997a), 54 vezes para *D. glomerata* (Yamamoto & Mino, 1985) e 70 vezes para a 1-FEH II de *C. intybus* (De Roover, et al., 1999).

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu purificar parcialmente quatro frações com atividade de FEH em rizóforos armazenados no frio, obtidos de plantas submetidas à brotação através da remoção dos ramos aéreos. Conforme mencionado anteriormente, Van den Ende et al. (2001), demonstraram que diferentes FEHs foram expressas em raízes tuberosas de *C. intybus* quando as plantas foram submetidas à desfoliação ou a baixas temperaturas. Como em *V. herbacea* estes tratamentos levaram ao aumento da atividade da FEH, é possível que as diferentes frações ativas aqui obtidas sejam resultantes da expressão de isoformas de FEH induzida por estes tratamentos. Entretanto, para que esta afirmação possa ser feita será necessária a realização da purificação das frações ativas à homogeneidade eletroforética e o subsequente estudo da expressão gênica sob as diferentes condições acima mencionadas.

4.4 Conclusões

- O extrato enzimático de rizóforos de *V. herbacea* mostrou atividade ótima em pH 4,5 e temperatuta de 30 ºC. A atividade em diferentes concentrações de substato mostrou uma curva de velocidade sigmoidal, sugerindo que a FEH desta espécie é uma enzima alostérica.
- O extrato enzimático apresentou maior atividade sobre frutanos com ligações do tipo β-2,1, encontrados em *V. herbacea*, *H. tuberosus* e *V. discolor*, do que sobre frutanos com ligações do tipo β-2,6, encontrados em levano de *G. macrocephala*, indicando a alta especificidade da FEH de *V. herbacea* por frutanos com ligações do tipo β–2,1.
- O extrato enzimático apresentou maior afinidade por frutanos de cadeias curtas, característicos de *V. herbacea* e *H. tuberosus*, do que sobre frutanos de cadeias longas, característicos de *V. discolor*.

- Utilizando precipitação com sulfato de amônio (20-80%), cromatografia de afinidade (concanavalina A) e cromatografias de troca iônica e exclusão molecular e eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio, foi possível separar diferentes FEHs de rizóforos de *V. herbacea*, podendo-se distinguir quatro frações com atividade de FEHs em rizóforos de plantas induzidas à brotação. Destas quatro frações, duas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, sendo que os pesos moleculares estimados para uma delas foi de 21 kDa e para outra, esta medida situou-se entre 155 e 39 kDa, devido à ampla faixa de exclusão da coluna utilizada. Os pesos moleculares das outras duas frações foram estimados por SDS-PAGE, sendo que as bandas visualizadas corresponderam a 81,3 e 57,5 kDa para uma e 57,5 kDa para a outra fração.

5 CONCLUSÕES FINAIS

- A despolimerização de frutanos e a brotação são processos concomitantes em *V. herbacea* que ocorrem naturalmente durante o ciclo fenológico e também podem ser induzidos através da poda dos ramos aéreos.
- A FFT parece atuar junto à FEH na diminuição do tamanho das cadeias de frutanos durante a rebrota, enquanto a SST é inibida devido, possivelmente, à interrupção do fornecimento de sacarose aos rizóforos pelos órgãos aéreos.
- O extrato bruto apresentou, para a FEH, um pH ótimo de 4,5, temperatura ótima em 30 ºC e uma curva sigmoidal de concentração de substrato, sugerindo que esta hidrolase seja uma enzima alostérica.
- O extrato bruto apresentou maior atividade de FEH sobre frutanos com ligações do tipo β-2,1, encontrados em *V. herbacea, H. tuberosus* e *V. discolor,* do que sobre frutanos com ligações do tipo β-2,6, encontrados em levano de *G. macrocephala*, indicando a alta especificidade desta enzima por frutanos com ligações do tipo β-2,1, além de maior afinidade por frutanos de cadeias curtas, característicos de *V. herbacea* e *H. tuberosus,* do que sobre frutanos de cadeias longas, característicos de *V. discolor*.
- Utilizando precipitação com sulfato de amônia, cromatografias de afinidade, de troca iônica e exclusão molecular e eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio, foram purificadas parcialmente quatro frações com atividades de FEHs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. Fisiologia renal. In: AIRES, M.M. (Ed) **Fisiologia**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991, p. 495-583.

ALBRECHT, G.; KAMMERER, S.; PRAZNIK, W.; WIEDENROTH, E.M. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following re-aeration. **New Phytologist,** v.123, p. 471-476, 1993.

ASEGA, A.F.; CARVALHO, M.A.M. Sprouting and fructan exohydrolase activity in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 28, Caxambú, 1999. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1999, p.98.

BIELESKI, R. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. **Plant Physiology,** v.103, p. 213-219, 1993.

BONNETT, G.D.; SIMPSON, R.J. Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* (Gaudin). **New Phytologist,** v.123, p. 443-451, 1993.

BONNETT, G.D.; SIMPSON, R.J. Fructan exohydrolase activities from *Lolium rigidum* that hydrolyze β-2,1 and β-2,6-glycosidic linkages at different rates. **New Phytologist,** v.131, p. 199-209, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgam quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** v.72, p. 248-254, 1976.

CAIRNS, A.J.; NASH, R.; CARVALHO, M.A.M.; SIMS, I.M. Characterization of the enzymatic polymerization of the 2,6-linked fructan by leaf extracts from timothy grass (*Phleum pratense*). **New Phytologist,** v.142, p. 79-91, 1999.

CAIRNS, A.J.; BONNETT, G.D.; GALLAGHER, J.A.; SIMPSON, R.J.; POLLOCK, C.J. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum*. VI Sucrose and fructan hydrolysis by a fructan-polymerizing enzyme preparation. **New Phytologist,** v.136, p. 61-72, 1997.

CAIRNS, A.J.; POLLOCK, C.J.; GALLAGHER J.A.; HARRISON, J. Fructans: synthesis and regulation. In: LEEGOOD, R.C.; SHARKEY, T.D.; VON CAEMMERER, S. (Eds) **Advances Photosynthesis: Physiology and Metabolism.** Dordrect: Kluwer Academic Publishers, 2000, vol 9, pp 301-320.

CARPITA, N.C.; KELLER, F.; GIBEAUT, D.M.; HOUSLEY, T.L.; MATILE, P. Synthesis of inulin oligomers in tissue slices, protoplasts and intact vacuoles of Jerusalem artichoke. **Journal of Plant Physiology,** v.138, p. 204-210, 1991.

CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist,** v.123, p. 735-740, 1993.

CARVALHO, M.A.M. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In**:** LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; WITTIG DE PENNA, E.; MENEZES, E.W. (Eds) **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTED XI.6,** São Paulo: Editora Varela, 2001, p. 77-90.

CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasilieira de Botânica,** v.21, p. 281-285, 1998.

CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; DIETRICH, S.M.C. Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, v.136, p. 153-161, 1997.

CLAESSENS, G.; VAN LAERE, A.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Journal of Plant Physiology,** v.136, p. 35-39, 1990.

DE HALLEUX, S.; VAN CUTSEM, P. Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from chicory root (Accession nº U81520)(PGR97-036). **Plant Physiology,** v.113, p. 1003, 1997.

DE ROOVER, J.D.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W.. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). **Physiologia Plantarum,** v.106, p. 158-163, 1999a.

DE ROOVER, J.D.; VAN LAERE, A.; WINTER, M.D.; TIMMERMANS, J.W.; VAN DEN ENDE, W. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum,** v.106, p. 28-34, 1999b.

DE ROOVER, J.D.; VANDENBRANDEN, K.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Planta,** v. 210, p. 808-814, 2000.

DEGASPERI, M.I. Metabolismo enzimático de frutanos em raízes tuberosas de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). São Paulo, 1998. 88p. **Dissertação (MS)** - Universidade de São Paulo.

DIAS-TAGLIACOZZO, G.M.; DIETRICH, S.M.C.; MELLO-AIRES, M. Measurement of glomerular filtration rate using inulin prepared from *Vernonia*

herbacea, a Brazilian native species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v.29, p. 1393-1396, 1996.

DYSSELER, P.; HOFFEM, D. Inulin, an alternative dietary fibre: properties and quantitative analysis. **European Journal of Clinical Nutrition,** v.49, p.145-152, 1995.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Biochemical Journal,** v.93, p. 148-161, 1964.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplied in *Helianthus tuberosus.* **New Phytologist,** v.67, p.517-531, 1968.

ERNST, M.; PFENNING, J. Fructan in stem exudates of *Helianthus tuberosus* L. In: FUCHS, A. (Ed) **Proceedings of the Eighth Seminar on Inulin**, Stuttgart, 2000, p. 56-58.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica,** v. 9, p. 159-166, 1986.

FREHNER, M.; KELLER, F.; WIENKEN, A. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). **Journal of Plant Physiology,** v.116, p. 197-208, 1984.

FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science Plant Nutrition,** v.43, p. 171-177, 1997.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition,** v.125, p. 1402-1412, 1995.

HELLWEGE, E.M.; GRITSCHER, D.; WILLMITZER, L.; HEYER, A.G. Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. **Plant Journal,** v.12, p. 1057-1065, 1997.

HELLWEGE, E.M.; RAAP, M.; GRITSCHER, D.; WILLMITZER, L.; HEYER, G. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. **FEBS Letters,** v.427, p. 25-28, 1998.

HENDRY, G. A. F. Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist,** v.123, p. 3-14, 1993.

HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N.J. (Eds) **Science and Technology of Fructans**, Boca Raton: CRC Press, 1993, p. 119-139.

HENSON, C.A.; LIVINGSTON, D.P. Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes β-2,6-fructans. **Plant Physiology,** v.110, p. 639-644, 1996.

HENSON, C.A.; LIVINGSTON, D.P. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. **Plant Physiology and Biochemistry,** v.36, p. 715-720, 1998.

INCOLL, L.D.; BONNETT, G.D. Fructans in the compositae - a short review. In: CALIGARI, P.D.S.; HIND, D.J.N. (Eds) **Compositae : Biology & Utilization**, Kew: Proceedings of the International Compositae Conference, 1996, v. 2, p. 401- 413.

ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. **Plant and Cell Physiology,** v.34, p. 723-727, 1993.

ITAYA, N.M. Purificação e caracterização comparada das enzimas de síntese de degradação de frutanos em *Viguiera discolor* Baker e *Polymnia sonchifolia* Poep. Endl. (Asteraceae). São Paulo, 2002, 155p. **Tese de Douturado**, Universidade de São Paulo.

ITAYA, N.M.; BUCKERIDGE, M.S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Biosynthesis in vitro of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). **New Phytologist,** v.136, p. 53-60, 1997.

JEONG, B.; HOUSLEY, T.L. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. **Plant Physiology,** v.93, p. 902-906, 1990.

JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in the presence of aldohexoses. **Nature,** v.177, p. 38 – 39, 1956.

KANAYA, K.I.; CHIBA, S.; SCHIMOMURA, T. Thin layer chromatography of linear oligosaccharides. **Agricultural and Biological Chemistry,** v.42, p. 1947-1948, 1978.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosacharides. In: PREISS, J. (Ed) **The Biochemistry of Plants,** New York: Academic Press, 1980, v. 3, p. 221-270.

KOOPS, A.J.; JONKER, H.H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Colombia': I Fructan: fructan fructosyltransferase. **Journal of Experimental Botany,** v.45, p. 1623-1631, 1994.

KOROLEVA, O.A.; TOMOS, A.D.; FARRAR, J.F.; GALLAGHER, J.; POLLOCK, C.J. Carbon allocation and sugar status in individual cells of barley leaves affects expression of sucrose: fructan 6-fructosiltransferase gene. **Annals of Applied Biology,** v.138, p. 27-32, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v.227, p. 680-685, 1970.

LEGNANI, G.; MILLER, W.B. Short photoperiods induce fructan accumulation and tuberous root development in *Dahlia* seedlings. **New Phytologist,** v.149, p. 449-454, 2001.

LIVINGSTON, D.P.; HENSON, C.A. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat : responses to second-phase cold hardening. **Plant Physiology,** v. 116, p. 403-408, 1998.

LIVINGSTON, D.P.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena spp*) **New Phytologist,** v.123, p. 725-734, 1993.

LUSCHER, M.; ERDIN C.; SPRENGER, N.; HOCHSTRASSER, U.; BOLLER T.; WIEMKEM, A. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. **FEBS Letters,** v.385, p. 39-42, 1996.

LUSCHER, M.; HOCHSTRASSER, U.; VOGEL, G.; AESCHBACHER, R.; GALATI, V.; NELSON, C.J.; BOLLER T.; WIEMKEM, A. Cloning and functional analysis of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from tall fescue. **Plant Physiology,** v.124, p. 1217-1227, 2000.

LUSCHER, M.; FREHNER, M.; NOSBERGER, J. Purification and characterization of fructan: fructan frutosyltransferase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **New Phytologist,** v.123, p. 717-724, 1993.

MANTOVANI, W. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, Estado de São Paulo .São Paulo, 1983, 147p. **Dissertação (MS),** Universidade Estadual de Campinas.

MARX, S.P.; NOSBERGER, J.; FREHNER, M. Seasonal variation of fructan-β-fructosidase (FEH) activity and characterization of a β-(2,1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). **New Phytologist,** v.135, p. 267-277, 1997a.

MARX, S.P.; NÖSBERGER, J.; FREHNER, M. Hydrolyses of fructan in grasses: a β (2,6) linkage specific fructan - β - fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. **New Phytologist,** v.135, p. 279 – 290, 1997b.

MEIER, H.; REID, J. S. G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: LOEWUS, F.A. & TANNER. SPRINGER-VERLAG, W. (Eds) **Encyclopedia of Plant Physiology,** Heidelberg, 1982, vol 13 A, p. 418- 471.

MENEZES, N.L.; MULLER, C.; SAJO, M.G. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). **Boletim de Botânica**, v.7, p. 33-38, 1979.

MORVAN, A.; CHALLE, G.; PRUD`HOMME, M.P.; LE SAOS, J.; BOUCAD, J. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. **New Phytologist,** v.136, p. 81-88, 1997.

MORVAN-BERTRAND, A.; ERNSTSEN, A.; LINDGÄRD, B.; KOSHIOKA, M.; LE SAOS, J.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P.; JUNTTILA, O. Endogenous gibberellins in *Lolium perenne* and influence of defoliation on their contents in elongating leaf bases and in leaf sheaths. **Physiologia Plantarum,** v.11, p. 225-231, 2001.

MORVAN-BERTRAND, A.; PAVIS, N.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ^{13}C steady-state labelling and carbohydrate analysis. **Plant Cell and Environment,** v.22, p. 1097-1108, 1999.

MULLER, J.; AESCHBACHER, R.A.; SPRENGER, N.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Disscharide–mediated regulation of sucrose: fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. **Plant Physiology,** v.123, p. 265-274, 2000.

NAGAMATSU, Y.; YAHATA, M.; HATANAKA, C. Fructan mobilization and the involvement of two β–fructofuranosidases in *Lycoris radiata* sprouting. **Agricultural and Biological Chemistry,** v.55, p. 3091-3095, 1991.

NAGARAJ, V.J.; RIEDL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; MEYER, A.D. Light and sugar regulation of the barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase promoter. **Journal of Plant Physiology,** v.158, p.1601-1607, 2001.

NOEL, G.M.; TOGNETTI, J.A.; PONTIS, H.G. Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. **Planta**, v.213, p. 640-646, 2001.

OBENLAND, D.M.; SIMMEN, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare*) leaves. **Plant Physiology,** v.101, p. 1331-1339, 1993.

ORTHEN, B. Sprouting of the fructan-and-starch geophyte *Lachenalia minima*: effects on carbohydrate and water content within the bulbs. **Physiologia Plantarum,** v.113, p. 308-314, 2001.

PAVIS, N., BOUCAD, J. & PRUD`HOMME, M.P. Immediate effects of defoliation on fructan and fructan exohidrolase activity in *Lolium perenne* L. In: FUCHS, A.; VAN LAERE, A. (Eds) **Proceedings of the Seventh Seminar on Inulin**, Leuven: European Fructan Association, 1998.

PAVIS, N.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BAUMGARTNER, S.; PRAZNIK, W.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. **New Phytologist,** v.150, p. 83-95, 2001.

PENSON, S.P.; CAIRNS, A.J. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of the novo synthesis in vivo and in vitro. **New Phytologist,** v.128, p. 395-402, 1994.

PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. **Plant Physiology,** v.107, p. 125-130, 1995.

POLLARD, C.J.; AMUTI, K.S. Fructose oligossacharides, possible markers of phylogenetic relationships among dicotyledonous plant families. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.9, p. 69-78, 1981.

POLLOCK, C. J.; CAIRNS, A.J.; SIMS, I.M.; HOUSLEY, T.L. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A.A. (Eds) **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source - Sink Relationships**, New York: A.A. Marcel Dekker Inc, 1996, p. 97-113.

POLLOCK, C.J.; CHATTERTON, N.J. Fructans. In: PREISS, J. (Ed) **The Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise,** New York: Academic Press, 1988, v. 14, p. 109-140.

POLLOCK, C.J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist,** v.104, p. 1-24, 1986.

PONTIS, H.G.; DEL CAMPILLO, E. Fructans. In: DEY, P.M. & DIXON, R.A. (Eds) **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**, New York: Academic Press, 1985, p. 205-226.

PRUD'HOMME M.P.; GASTAL, F.; BELANGER, G.; BOUCAUD, J. Temperature effects on partitioning of ^{14}C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). **New Phytologist,** v.123, p. 255-261, 1993.

RHODES, M.J.C. The extration and purification of enzymes from plant tissues. In: Smith, H. (Ed) **Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants**, London: Academic Press, 1977, p. 245-269.

RIBEIRO SOBRINHO, D. S.; BUCKERIDGE, M. S.; CARVALHO, M.A.M. Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby and its role in fructan mobilization. In: Third International Fructan Conference, Utah, 1996. **Resumos**. Utah: Third International Fructan Conference, 1996, p45.

ROBERFROID, M.B. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v.33, p. 103-148, 1993.

ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C.; CUMMINGS, J.H. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition Reviews,** v.53, p. 127-130, 1995.

RUTHERFORD, P.P.; DEACON, A.C. Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid**. Annals of Botany,** v. 38, p. 251-260, 1974.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa, 1998, 556p.

SEGEL, I.H. Bioquímica: teoria e problemas . Rio de Janeiro : Livros técnicos e científicos, 1979, 527p.

SHIOMI, N.; ONODERA, S.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Structure of fructan polymers from tuberous roots from *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. **New Phytologist,** v.133, p. 643-650, 1996.

SILVA, R.F. Use of inulin as a natural texture modifier. **Cereal Foods World,** v.41, p. 792-794, 1996.

SIMMEN, U.; OBENLAND, D.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Fructan synthesis in excised barley leaves. **Plant Physiology,** v.101, p. 459-468, 1993.

SIMPSON, R.J.; BONNETT, G.D. Fructan exohydrolase from grasses. **New Phytologist,** v.123, p. 453-469, 1993.

SIMPSON, R. J.; WALKER, R. P.; POLLOCK, C. J. Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. **New Phytologist,** v.119, p. 527-536, 1991.

SMART, D.R.; CHATTERTON, N.J.; BUGBEE, B. The influence of elevated CO_2 on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. **Plant Cell and Environment,** v.17, p. 435-442, 1994.

SOLHAUG, K.A.; AARES, E. Remobilization of fructans in *Phippsia algida* during rapid inflorescence development. **Physiologia Plantarum,** v.91, 219-225, 1994.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry,** v.160, p. 61-63, 1945.

SPRENGER, N.; BORTLIK, K.; BRANDT, A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Purification, cloning and functional expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v.92, p. 11652-11656, 1995.

TEIXEIRA, P.G.; CARVALHO, M. A. M.; ZAIDAN, L.B.P.; KLEIN, AL. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p. 89-96, 1997.

TERTULIANO, M.F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. **New Phytologist,** v.123, p. 741-749, 1993.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE A. Purification and properties of an invertases with sucrose: sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of *Cichorium* intybus. **New Phytologist,** v.123, p. 31-37, 1993.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE A. *De-novo* synthesis of fructans from sucrose *in vitro* by a combination of two purified enzymes (sucrose: sucrose 1-

fructosyl transferase and fructan: fructan 1-fructosyl transferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Planta,** v.200, p. 335-342, 1996a.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. **Journal of Plant Physiology,** v.149, p. 43-50, 1996b.

VAN DEN ENDE, W.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE A. *In vitro* synthesis of fructo-oligossaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan: fructan fructosyltransferase. **Physiologia Plantarum,** v.97, p. 346-352, 1996.

VAN DEN ENDE, W.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). **Physiologia Plantarum,** v.106, p. 158-163, 1999a.

VAN DEN ENDE, W.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus* L.). **Physiologia Plantarum,** v.105, p. 2-8, 1999b.

VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. **The Scientific World JOURNAL ,** v. 2, p. 1281-1295, 2002.

VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; DE ROOVER, J.; VERHAERT, P.; VAN LAERE, A. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEHI): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. **Plant Journal,** v.24, p. 447-456, 2000.

VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; VAN WONTERGHEM, D.; CLERENS, S.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two

isoforms (1-FEHIIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. **Plant Physiology,** v.126, p. 1186-1195, 2001.

VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; VAN WONTERGHEM, D.; VERGAUWEN, R.; VAN LAERE, A. Cloning, developmental and tissue-specific expression of sucrose: scucrose 1-fructosylltransferase from *Taraxacum officinale.* Fructan localization roots. **Plant Physiology,** v.123, p. 71-79, 2000b.

VAN DER MEER, I.M.; KOOPS, A.J.; HAKKERT, J.C.; VAN TUNEN, AJ. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. **Plant Journal,** v.15, p, 489-500, 1998.

VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. **Plant, Cell and Environment,** v.25, p. 803-813, 2002.

VERGAUWEN, R.; VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. **Journal of Experimental Botany,** v.51, p. 1261-1266, 2000.

VIEIRA, C.C.J. ; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructose containing carbohydrates in tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant Cell and Environment,** v.16, p. 919-928, 1993.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology,** v.120, p. 351-359, 1999.

VIJN, L.; VAN DIJKEN, A.; LÜSCHER, M.; BOS, A.; SMEETS, E.; WEISBEEK, P.; WIEMKEN, A.; SMEEKENS, S. Cloning of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined molecules from sucrose. **Plant Physiology,** v.117, p. 1507-1513, 1998.

VIJN, L.; VAN DIJKEN, A.; SPRENGER, N.; VAN DUN, K.; WEISBEEK, P.; WIEMKEN, A.; SMEEKENS, S. Fructan of the inulin neoseries is synthesized

in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus*) harbouring onion (*Allium cepa*) fructan: fructan 6G fructosyltransferase. **Plant Journal,** v.11, p. 387-398, 1997.

WAGNER, W.; WIEMKEN, A. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). **Journal of Plant Physiology,** v.123, p. 419-428, 1986.

WANG, C.; VAN DEN ENDE, W.; TILLBERG, J.E.. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. **Planta,** v.211, p. 701-707, 2000.

WEI, J.Z.; CHATTERTON, N.J.; LARSON, S.R. Expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) and myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) genes in barley (*Hordeum vulgare*) leaves. **Journal of Plant Physiology,** v.158, p. 635-643, 2001.

WIEMKEN, A.; SPRENGER, N.; BOLLER, T.. Fructans – an extension of sucrose by sucrose. In: PONTIS, H.G.; SALERNO, G.L.; ECHEVERRIA, E.J. (Eds) **Current Topics in Plant Physiology,** Rockville, 1995, v.14, p. 179-189.

WISE, C.S.; DIMLER, R.J.; DAVIES, H.A.; RIST, C.E. Determination of easily hidrolysable fructose units in dextran preparations. **Analytical Chemistry,** v.27, p. 33–36, 1955.

YAMAMOTO, S.; MINO, Y. Effect of sugar level on phleinase induction in stem base of orchardgrass after defoliation. **Physiologia Plantarum,** v.69, p. 456-460, 1987.

YAMAMOTO, S.; MINO, Y. Mechanism of phleinase induction in the stem base of orchardgrass after defoliation. **Journal of Plant Physiology,** v.134, p. 258-260, 1989.

YAMASAKI, H.; MATSUMOTO, K. Production of fructo-oligosaccharides-rich fructose syrup. In: FUCHS, A. (Ed) **Inulin-Containing Crops**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993, p. 355-357.